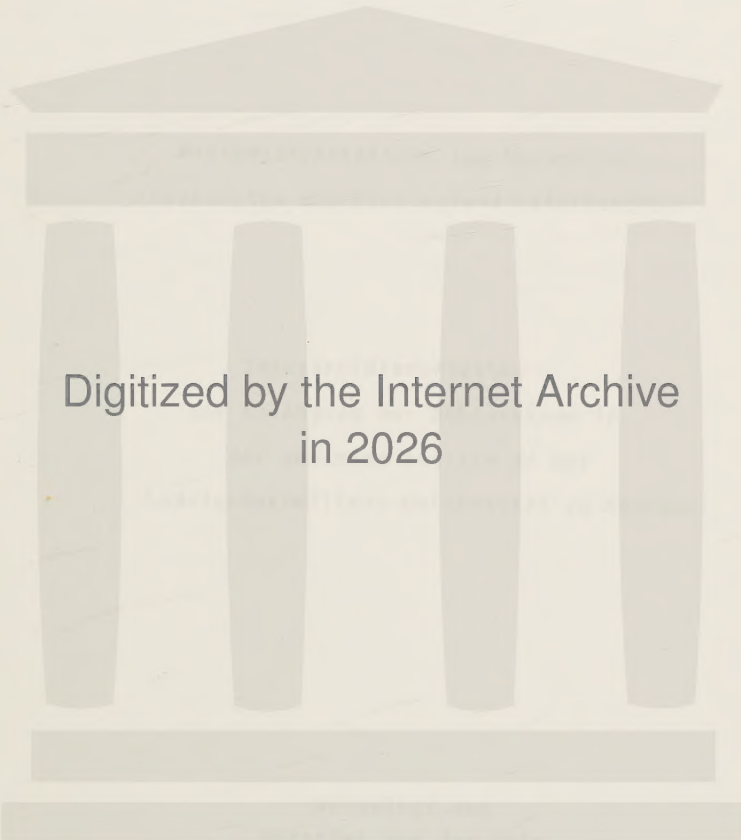


Histaminfreisetzung aus basophilen
Leukozyten und Prostaglandinstoffwechsel

Dorothea von der Helm

*Diss
München
1904*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548306_0045

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München

(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. O. Braun-Falco)

Histaminfreisetzung aus basophilen
Leukozyten und Prostaglandinstoffwechsel

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in
der gesamten Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dorothea von der Helm
aus Germering

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Ring

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil veröffentlicht:

D. von der Helm, J. Ring and W. Dorsch

Influence of Prostaglandin E_2 and Indomethacin
on Histamine Releasability of Peripheral Leucocytes
from Atopic and Normal Individuals

Arch. Derm. Res. 275, 218 (1983)

A	Einleitung	4
1.	Allgemeine Einführung	
2.	Fragestellung: Wie wird die Freisetzung von Histamin aus basophilen Leukozyten durch Beeinflussung der Prostaglandinsynthese verändert?	
B	Material und Methoden	8
1.	Auswahl der Patienten	8
2.	Isolierung der Leukozyten	11
3.	Stimulation der basophilen Leukozyten	13
3.1	Kinetik-Versuche mit Indomethacin	14
3.2	Kinetik-Versuche mit Prostaglandin E_2	16
3.3	Kinetik-Versuche mit Acetylsalicylsäure	16
3.4	Kinetik-Versuche mit Glutathion	16
4.	Histaminmessung	17
5.	Prostaglandin E_2 -Bestimmung	17
6.	Reagenzien	18
7.	Statistische Methoden	21
C	Ergebnisse	22
1.	Vorversuche zur Methodologie	22
1.1	Auswahl eines geeigneten Stimulationsmittels	22
1.2	Stimulation von Leukozyten nach Ficoll-Isolierung	24
1.3	Versuche zur Spezifität der Histaminmessung	27
1.4	Versuche zur Spezifität der Prostaglandin E_2 -Bestimmung	28

2.	Ergebnisse der Stimulationsversuche mit Anti-IgE	30
2.1	Histaminfreisetzung	30
2.1.1	Unterschiede im Gesamtgehalt an Histamin und in der spontanen Histaminfreisetzung bei Atopikern und der Kontrollgruppe	30
2.1.2	Kinetik der Histaminfreisetzung	31
2.1.3	Einfluß verschiedener Substanzen auf die Histaminfreisetzung	34
2.1.3.1	Erhöhung der Histaminfreisetzung durch Indomethacin	34
2.1.3.2	Erhöhung der Histaminfreisetzung durch Acetylsalicylsäure	38
2.1.3.3	Verminderung der Histaminfreisetzung durch Prostaglandin E_2	40
2.2	Prostaglandinentstehung (PGE_2)	44
2.2.1	Höhe und zeitlicher Verlauf des Prostaglandin E_2 -Gehalts im Zellüberstand nach Stimulation mit Anti-IgE bei Atopikern und der Kontrollgruppe	44
2.2.2	Einfluß verschiedener Substanzen auf die PGE_2 -Entstehung	46
2.2.2.1	Einfluß von Indomethacin	46
2.2.2.2	Einfluß von Acetylsalicylsäure	46
2.2.2.3	Einfluß von Glutathion	48
2.3	Vergleich zwischen Histaminfreisetzung und Prostaglandin E_2 -Entstehung nach Stimulation mit Anti-IgE	50
2.3.1	Höhe und zeitlicher Verlauf	50
2.3.2	Einfluß von Acetylsalicylsäure	51
2.4	Histaminspiegel nach wiederholter Stimulation	53
2.4.1	Doppelstimulation der mit Indomethacin vorbehandelten Leukozyten	53
2.4.2	Doppelstimulation der mit PGE_2 -vorbehandelten Leukozyten	55

D Diskussion	57
1. Die Rolle der Prostaglandine bei der Histaminfreisetzung	58
2. "Releasability" bei Atopikern und gesunden Personen	68
3. Das Phänomen der Tachyphylaxie	71
 E Zusammenfassung	 73
 F Literatur	 75
 G Danksagung	 93
 H Lebenslauf	 94

A Einleitung

Das klinische Bild der allergischen Sofortreaktion wird durch Mediatorsubstanzen (z. B. Histamin) hervorgerufen (8, 87), die vorwiegend von Mastzellen und basophilen Leukozyten freigesetzt werden (3, 5, 18, 50, 59, 89a). Andere Substanzen werden offensichtlich während der allergischen Reaktion neu gebildet, u. a. die Derivate der Arachidonsäure; zu ihnen gehören die Prostaglandine und Leukotriene.

1879 wurde von Paul Ehrlich im Blutaussstrich eine basophil getüpfelte Zelle entdeckt und von ihm als Vorstufe der eosinophilen Leukozyten betrachtet (21, 22). Der Anteil der basophilen Leukozyten an den weißen Blutzellen beträgt höchstens 1 - 2 %. Trotz ihrer relativ geringen Zahl können sie eine enorme Wirkung hervorrufen. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche (ähnlich wie die Mastzellen) IgE-Antikörper, die mit ihrem Fc-Ende an die äußere Zellmembran gekoppelt sind. Die Zahl der IgE-Moleküle pro Zelle schwankt zwischen 4000 und 400.000 und ist unter anderem abhängig von der Höhe des IgE-Spiegels im Serum (43, 61).

Ishizaka beschrieb die IgE-Moleküle als eine der möglichen Ursachen für die Histaminfreisetzung aus menschlichen Leukozyten (43). Das Vorhandensein eines "Reagins" wurde im übrigen schon von Prausnitz und Küstner 1921 bewiesen (84). Die IgE-Moleküle auf der Zelloberfläche werden durch Allergene (oder z. B. Anti IgE), die als "Brückenbildner" fungieren, miteinander verbunden; dadurch werden mehrere Reaktionen ausgelöst (Ca-Einstrom, Wanderung der histaminhaltigen Vesikel an die Zelloberfläche), an deren Ende die Histaminfreisetzung steht.

Es ist aber auch eine "direkte" Histaminliberation möglich, und zwar durch direkte Ca-Aktivierung (Ca-Ionophore), durch aktiviertes Komplement (z.B. C5a (Anaphylatoxin)), sowie Phorbol ester (80, 81, 86, 87, 101). Direkt gegen den IgE-Rezeptor gerichtete Antikörper führen ebenfalls zur Histaminfreisetzung (71 a).

Histamin ist nur eine von vielen Substanzen, die bei der allergischen Reaktion freigesetzt werden oder im Verlauf der Reaktion entstehen; weitere Mediatoren sind Serotonin, PAF (platelet activating factor), chemotaktische Mediatoren, Heparin und die Derivate der Arachidonsäure, zu denen die SRS-A (Leukotrien C und D) und die Prostaglandine gehören (33, 49, 54, 58). Diese Mediatorsubstanzen erzeugen das klinische Bild der Allergie.

Mit besonderem Interesse wandte man sich in den letzten Jahren den Prostaglandinen und ihrer Bedeutung für die Allergie zu (69, 106). Sie sind bekannt als Entzündungsmediatoren mit z. T. starker Wirkung auf die Kontraktion glatter Muskulatur (26, 47, 71, 73). Da sie auch bei der allergischen Reaktion entstehen und ihre Subtypen (PGE, PGI, Thromboxan A, Thromboxan B) z. T. antagonistische Eigenschaften haben, hoffte man, aus der Kenntnis ihrer Wirkung neue Erkenntnisse über den Ablauf der allergischen Reaktion zu gewinnen. So fand Bach et al. 1977, daß SRS-A, eine seit langem bekannte Substanzgruppe, die bei der allergischen Reaktion freigesetzt wird, Derivate der Arachidonsäure sind (7). Sie sind durch die Arbeitsgruppe Samuelsson biochemisch definiert und heißen jetzt Leukotriene (73, 93, 94). Sie werden aus der Arachidonsäure durch das Enzym Lipoxxygenase gebildet; Prostaglandine und ihre nächsten Verwandten, die Thromboxane, entstehen aus der Arachidonsäure auf dem Weg der Zyklooxygenase. Die Leukotriene wie die Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Allergie, sei es, daß sie selbst Mediatoren darstellen oder daß sie andere Mediatoren in ihrer Freisetzung oder Wirkung beeinflussen. Es ist z. B. bekannt, daß $\text{PGF}_2\alpha$ in geringsten Konzentrationen eine starke konstringierende Wirkung auf die Bronchialmuskulatur hat, PGE_2 hingegen muskelrelaxierend wirkt (71). Es werden auch Einflüsse auf die Liberation von Mediatorsubstanzen aus der Mastzelle und den basophilen Leukozyten, wie auch Einfluß auf die Höhe des intrazellulären c-AMP-Spiegels diskutiert (11).

Es wird seit einigen Jahren versucht, durch Anwendung verschiedener chemischer, z. T. natürlich vorkommender Substanzen die Freisetzung von Histamin aus basophilen Leukozyten und Mastzellen zu modulieren.

Indomethacin und Acetylsalicylsäure, zwei Zyklooxygenasehemmer (und damit Hemmer der Prostaglandinsynthese) sollen zu einer vermehrten Mediatorfreisetzung führen (63, 69, 75). Ob nun diese vermehrte Histaminfreisetzung auf die Hemmung der Prostaglandinsynthese zurückzuführen ist, oder ob eine verstärkte Bildung von Lipxygenaseprodukten (u. a. Leukotriene) dafür verantwortlich ist, ist ein zentrales Thema meiner Arbeit.

Ein bekanntes klinisches Beispiel für die Auswirkung der Zyklooxygenasehemmung ist das sog. "Aspirin-induzierte Asthma bronchiale": da beim Asthma bronchiale die wesentliche Mediatorsubstanz "SRS-A" (slow reacting substance of anaphylaxis) - ein Lipxygenaseprodukt) ist (54, 108, 109, 110), liegt die Vermutung nahe, daß sich durch Blockierung der Zyklooxygenase der Reaktionsablauf zugunsten der Lipxygenase verschiebt und vermehrt SRS-A gebildet wird und zum klinischen Bild des Asthma bronchiale führt. Durch ETYA (eicosatetraynoic acid) - einem Analogon zur Arachidonsäure und einem Inhibitor für beide Enzyme - ist es möglich, die Mediatorfreisetzung zu unterdrücken (110).

Ein weiterer wichtiger Punkt meiner Arbeit ist die Frage, ob sich zwischen Atopikern und gesunden Personen ein Unterschied im Freisetzungsverhalten der Basophilen zeigt. Zum Teil wird eine erhöhte "Releasability" der Atopiker als wesentliche Ursache für das klinische Bild der allergischen Sofortreaktion beschrieben (13).

Ob Prostaglandine eine "Schutzwirkung" haben, soll u. a. durch wiederholte Stimulationen der Leukozyten (nach vor-

heriger Inkubation mit PGE_2) untersucht werden. Bei mehrfachen bronchialen Stimulationen sensibilisierter Meer-schweinchen führte die Gabe von PGE_2 zu stark verminderten Reaktionen im Sinne einer Tachyphylaxie, während Indomethacin die Tachyphylaxieentwicklung verhinderte (16).

Endogen gebildetes PGE_2 spielt zwar in der Lunge (nach Mathé) eine untergeordnete Rolle, doch wird PGE_2 von Leukozyten gebildet und soll eine regulatorische Wirkung haben (75).

Zusammenfassung:

Das Ziel meiner Versuche war es

- 1) Die Höhe der Histaminfreisetzung und ihren zeitlichen Ablauf mit der Höhe der Prostaglandinproduktion zu vergleichen
- 2) Die Wirkung einer Hemmung der Prostaglandinsynthese auf die Höhe und den Verlauf der Histaminfreisetzung zu studieren
- 3) Durch PGE_2 die Histaminfreisetzung zu beeinflussen
- 4) Den Effekt einer Substanz mit hohem Reduktionspotential (Glutathion) zu beobachten
- 5) Durch wiederholte Stimulation evtl. eine Änderung im Reaktionsverhalten im Sinne einer Tachyphylaxie zu erzielen

Bei allen Versuchen sollten besonders die Unterschiede zwischen Atopikern und "Normalpersonen" berücksichtigt werden.

B) Material und Methoden

Es wurden gewaschene menschliche Leukozyten mit Allergenen stimuliert; anschließend wurde das dadurch aus den basophilen Leukozyten freigesetzte Histamin und das gebildete Prostaglandin E_2 gemessen.

1. Auswahl der Patienten

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 41 Atopikern und 17 Kontrollpersonen durchgeführt. Die 22 weiblichen und 19 männlichen Atopiker waren zwischen 7 und 50 Jahre alt; viele zeigten beim Prick-Hauttest eine starke Reaktion (+++) auf Pollen, (Gräser, Kräuter, Bäume), Tierhaare, Hausstaub oder Hausstaubmilbe. Einige hatten eine ausgeprägte Anamnese von Asthma bronchiale, Rhinitis allergica oder atopischem Ekzem.

Alle Patienten waren mindestens drei Tage lang ohne systemische Medikation und hatten mindestens ein halbes Jahr lang keine innerliche Corticoidtherapie erhalten. Sie waren zum Zeitpunkt der Testung bzw. der Versuche subjektiv erscheinungsfrei.

Im folgenden sind die wichtigsten anamnestischen Daten der 41 Atopiker tabellarisch zusammengefaßt:

Pat. Nr.	Name	Alter	Geschl.	kurze Angaben zur Anamnese (Prick-Test, PRIST, RAST)
1	G.C.	39	w	atopisches Ekzem, IgE = 400
2	B.G.	35	m	A.b., R.a., Hausstaubmilbe: (+++)
3	D.I.	15	w	atopisches Ekzem, IgE = 720
4	D.H.	49	w	A.b., Hundehaare: (+++)
5	K.B.	50	w	R.a., Baumpollen (++)
6	Z.C.	20	m	R.a., Gräser (++) , IgE = 178
7	R.K.	33	m	R.a., Tierhaare (+++)
8	W.B.	18	w	A.b., R.a., Pollen (+++) Hunde (+++), Pferde (+++)
9	S.J.	15	w	R.a., Pollen (+++), Hunde (+++)
10	S.A.	36	w	atopisches Ekzem
11	G.M.	45	w	A.b., R.a.
12	A.C.	33	w	A.b., Pollen (++) , Hausstaub (++)
13	M.A.	40	m	R.a., Hausstaubmilbe (+++)
14	K.H.	24	m	R.a., Pollen (+++), Gräser (+++)
15	W.H.	40	m	Pollen (++)
16	S.M.	28	w	R.a., Konjunktivitis allergica
17	S.L.	20	m	R.a., Pollen (+++), Tierhaare (+++) IgE = 442
18	Z.F.	46	m	A.b., R.a., Hausstaub (+)
19	F.G.	20	m	R.a., Pollen (++) , RAST: Hausstaub: 3 Milbe: 3
20	S.B.	7	w	all. Bronchitis, Pollen (++) , Tierhaare (++)

Abkürzungen: A.b. = Asthma bronchiale

R.a. = Rhinitis allergica

(+) - (++++) = Stärke der Prick-Test-Reaktion

Pat. Nr.	Name	Alter	Geschl.	kurze Angaben zur Anamnese (Prick-Test, PRIST, RAST)
21	N.N.	30	m	R.a., Pollen (+++)
22	H.B.	26	w	R.a., Pollen (++)
23	S.L.	24	m	Bienengiftallergie, Gräser (++) Haselnuß (++) , Roggen (++)
24	H.M.	20	w	R.a., Penicillin-Allergie
25	M.G.	43	w	A.b., Pollen (+++), Tierhaare (+++)
26	S.S.	25	m	A.b., Pollen (+++)
27	E.J.	20	m	A.b., ("Bäckerasthma"), R.a.
28	B.M.	20	w	R.a., Gräser (+++), Bäume (+++)
29	K.F.	28	w	R.a., Pollen (++)
30	D.W.	35	m	R.a., Pollen (++)
31	A.G.	25	m	A.b., RAST: Hausstaubmilbe: 3 - 4
32	N.N.	30	w	A.b., R.a.
33	N.N.	30	m	R.a., Pollen (++) , Tierhaare (++)
34	D.M.	24	w	R.a., Pollen (+++)
35	M.C.	36	m	A.b., Hausstaub (+++)
36	S.C.	31	w	R.a., Roggen (++)
37	S.N.	18	w	R.a., Roggen (+++)
38	B.N.	22	w	R.a., Gräser (+++)
39	W.C.	16	w	Nahrungsmittelallergie (Nüsse, Mohn)
40	R.J.	39	m	Hausstaubmilbe RAST 2
41	G.P.	24	m	R.a., Pollen (++)
42	P.F.	52	m	atopisches Ekzem IgE = 37.500
43	a.R.	16	w	A.b. bis vor 3 Jahren, R.a.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Als nicht-atopische Kontrollgruppe dienten Personen, die keine atopischen Erkrankungen in der Eigenanamnese sowie niedrige IgE-Serumspiegel hatten.

2. Isolierung der Leukozyten

Aus der Cubitalvene wurden in eine heparinisierte Spritze 25 ml Vollblut entnommen. Nach Zugabe von 5 ml Dextran 6 % wurde die Spritze für 60 Min. mit der Spitze nach oben an die Wand geklebt. Während dieser Zeit sedimentierten die Erythrozyten. Der Überstand bestand aus Plasma und Leukozyten, sowie noch einigen Erythrozyten und Thrombozyten und wurde über ein "Butterfly" Schlauchsystem in Kunststoffröhrchen gebracht.

Es folgte

- Zentrifugation 15 min, 400 xg, 4°C
- Abpipettieren des Überstandes
- Aufschwemmen der Zellen mit Tris-Calcium-Magnesium (TCM)-Puffer pH 7,4, 4°C
- Zentrifugation 10 min, 300 xg, 4°C,
- Aufschwemmen mit TCM-Puffer, 4°C
- Zentrifugation 10 min, 400 xg, 4°C
- Aufschwemmen mit TCM-Puffer auf das benötigte Volumen
- Zählen eines Aliquots in der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl im Endvolumen betrug durchschnittlich 5×10^6 pro ml.

In dem Bestreben, Granulozyten selektiv zu gewinnen, wurden bei einem Teil der Vorversuche die Leukozyten in Lymphozyten und Granulozyten geteilt, da es sich bei den basophilen Leukozyten nach Literatur um Granulozyten handelt (78).

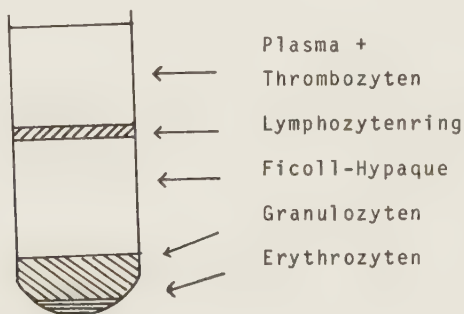
Die Trennung erfolgte mit Hilfe der Ficoll-Hypaque-Methode:

In zwei Reagenzgläsern wurden je 4 ml kaltes ($7 - 8^{\circ}\text{C}$) Ficoll-Hypaque gefüllt und darüber vorsichtig je 7 - 8 ml des Sedimentationsüberstandes geschichtet.

(Die Gesamtmenge des Überstandes betrug etwa 15 ml).

Anschließend wurde für 30 min bei 4°C und 400 g zentrifugiert, nachdem die Röhrchen mit ihrem Inhalt in der Zentrifuge einige Minuten abkühlen konnten.

Ficoll-Hypaque schiebt sich zwischen Granulozyten und Erythrozyten einerseits und Lymphozyten andererseits; es entsteht ein sogenannter Lymphozytenring:



Die oberen Schichten wurden vorsichtig abpipettiert und die Granulozyten dreimal in TCM-Puffer gewaschen. Das Aufschwemmen der Zellen geschah mit Plastikpipetten, um eine Traumatisierung zu vermeiden. Nach dem dritten Zentrifugieren (jeweils 15 min bei 4°C und 400 xg) wurden die Zellen auf das benötigte Volumen suspendiert und gezählt (Neubauer-Zählkammer). Die Zellzahl betrug ca. 5×10^6 Zellen pro ml Reaktionsvolumen.

3. Stimulation der basophilen Leukozyten

Die Freisetzungsversuche wurden in Kunststoffröhrchen im Wasserbad von 37°C durchgeführt.

Je 900 µl der Leukozytensuspension wurden 10 min bei 37°C präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz aufgeschüttelt, mit je 100 µl verdünnter Anti-IgE-Lösung (1:1000 verdünnt mit TCM-Puffer) versetzt und die Reaktion nach 1 min, 5 min, 10 min und 40 min durch Abkühlen im Eisbad gestoppt.

Zur Ermittlung des Leerwerts wurde anstelle der Anti-IgE-Verdünnung 100 µl TCM-Puffer pipettiert (pH 7,4, 37°C). Der Gesamtgehalt an Histamin wurde durch Lysieren der Zellen mit 100 µl Perchlorsäure 70 % (anstelle der Anti-IgE-Verdünnung) freigesetzt.

Um den Effekt einer zweifachen Stimulation zu studieren, wurden nach 30 min erneut 100 µl der Anti-IgE-Lösung in die entsprechenden Röhrchen pipettiert; diese Reaktion wurde 10 min später beendet. Nach der Abkühlung im Eisbad wurden die Röhrchen zentrifugiert (700 x g, 4°C, 15 min). 300 µl des Überstandes wurden vorsichtig abpipettiert und für die Prostaglandinbestimmung tiefgefroren (-80°C).

500 µl des Überstandes wurden mit 1,5 ml Perchlorsäure 2 % versetzt und für die Histaminbestimmung eingefroren (-18°C).

3.1 Kinetik-Versuche mit Indomethacin

Das Volumen der Zellsuspension nach dem Waschen wurde mit TCM-Puffer auf 15 ml gebracht. 0,5 ml davon benötigte ich für das Zählen der Zellen.

Es folgte folgendes Pipettierschema:

In 14 von 28 Kunststoffröhrchen:

- je 20 µl Indomethacin (2 mM, pH 7,8)
danach in alle 28 Röhrchen:
- je 400 µl TCM-Puffer (pH 7,4)
schließlich
- je 500 µl der Leukozytensuspension.

Es folgte die Präinkubation im Wasserbad (37°C, 10 min) und die Stimulation mit Anti-IgE. Die Reaktionen wurden durch Abkühlen im Eisbad beendet und die Zellen sofort abzentrifugiert (10 min, 4°C, 400 x g). Alle Versuche wurden doppelt angefertigt.

Folgendes Schema verdeutlicht die Verteilung des Indomethacins und den Zusammenhang mit der Reaktionsdauer:

Nr.	Puffer + Zellsuspension	Indo (2mM)	Stimulation	Reaktionsdauer
1	900 µl	Ø	100 µl TCM	Leerwert
2	"	Ø	"	"
3	"	20 µl	"	"
4	"	20 µl	"	"
5	"	Ø	100 µl Anti-IgE	1 min
6	"	Ø	"	1 min
7	"	20 µl	"	1 min
8	"	20 µl	"	1 min
9	"	Ø	"	5 min
10	"	Ø	"	5 min
11	"	20 µl	"	5 min
12	"	20 µl	"	5 min
13	"	Ø	"	10 min
14	"	Ø	"	10 min
15	"	20 µl	"	10 min
16	"	20 µl	"	10 min
17	"	Ø	"	40 min
18	"	Ø	"	40 min
19	"	20 µl	"	40 min
20	"	20 µl	"	40 min
21	"	Ø	2 x 100 µl Anti-IgE	Doppelstimu- tion, (Zeitpunkt 0 min und 30 min, En- de der Reaktion nach 40 min)
22	"	Ø	"	"
23	"	20 µl	"	"
24	"	20 µl	"	"
25	"	Ø	100 µl Per- chlors. 70%	100 %-Wert
26	"	Ø	"	"
27	"	20 µl	"	"
28	"	20 µl	"	"

Tabelle 2

3.2 Kinetik-Versuche mit Prostaglandin E_2 (PGE_2)

Diese Versuche erfolgten nach dem gleichen Schema wie die Kinetik-Versuche mit Indomethacin. Anstelle von Indomethacin wurde Prostaglandin E_2 in einer Konzentration von $2,8 \times 10^{-4} M$ eingesetzt; die Menge betrug 10 μl pro Probe (1 ml). Endkonzentration: $2,8 \times 10^{-6} M$.

3.3 Kinetik-Versuche mit Acetylsalicylsäure (ASA)

Diese Versuche wurden ebenfalls analog dem Indomethacin-Schema durchgeführt. Endkonzentration: $10^{-5} M$.

3.4 Kinetik-Versuche mit Glutathion (GSH)

Das Tripeptid GSH (Coenzym der PGE_2 Isomerase) ist ein starkes Reduktionsmittel aufgrund seines stark negativen Redoxpotentials ($E_0 = -0,25 V$). Bei der Verarbeitung von GSH muß daher jeder Kontakt mit Sauerstoff vermieden werden, da GSH sehr leicht in seine oxidierte Form übergeht und für die angestrebten Versuche nutzlos wird.

Eine 1 mM Lösung wurde deshalb bei jedem Versuch neu unter Stickstoffbegasung angefertigt.

GSH wurde bereits vor dem Waschen in den Zellen angereichert: In 2 heparinisierten Spritzen wurden jeweils genau 15 ml Blut abgenommen und je 2,5 ml Dextran 6 % dazugezogen. In eine der beiden Spritzen kam nun noch 0,5 ml GSH (1 mM, $\bar{c} N_2$).

Sedimentation und Waschen erfolgten wie üblich; die Stimulationsversuche wurden analog den Indomethacin und den Prostaglandinversuchen durchgeführt.

4. Histaminmessung

Die heute am meisten verwendete Methode zur Messung der Histaminkonzentration ist die von Shore et al. entwickelte Messung eines Histamin-o-Phthalaldehyd-Komplexes (98). Andere Methoden (biologischer Assay am Meerschweinchen-ileum oder enzymatischer Assay mit Methyltransferase) sind sehr aufwendig. Die Methode nach Shore umfaßt folgende Schritte:

- Reinigung durch Butanolextraktion
- Koppelung von o-Phthalaldehyd (OPT) an Histamin
- Aktivierung durch 350 nm
- Messung der Fluoreszenz bei 450 nm

Nach diesem Prinzip wurde von Siraganian et al. eine automatisierte Methode (Autoanalyzer) entwickelt (100).

Nach Beendigung der Stimulation durch Abkühlen im Eisbad wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4°C, 400 x g). 500 µl des Zellüberstandes (ca. 900 µl) wurden mit 2 ml Perchlorsäure (2 %) versetzt und entweder für die Histaminbestimmung eingefroren (-20°C) oder es erfolgte sofort die Histaminmessung im Autoanalyzer.

Nach jeder 6. Probennahme wurden 2 Standardproben (10 ng Histamin pro ml) gemessen, mit deren Hilfe der Histamingehalt der Proben errechnet wurde.

5. Bestimmung von Prostaglandin E₂ (PGE₂)

300 µl des Zellüberstandes wurden für die PGE₂-Bestimmung tiefgefroren (-80°C). Nach dem Auftauen wurden die Proben lyophilisiert, gelöst und jeweils in 3 Aliquots geteilt. Auf eine Extraktion konnte verzichtet werden, da es sich um ein proteinfreies Medium handelte. Von Adkinson (2) wurde in diesbezüglichen Versuchen (PGE₂ und PGE₂-Erzeugung von Leukozyten und Thrombozyten) festgestellt, daß eine Extraktion nicht erforderlich ist.

Es wurde ein Radio-Immuno-Assay in Dreifachbestimmungen durchgeführt, so daß pro Probe der PGE_2 -Gehalt von 100 μl Überstand gemessen wurde.

Die gemessenen Werte lagen z. T. unterhalb der Nachweisgrenzen, so daß ein großer Teil der Versuche nicht ausgewertet werden konnte. Die beschriebenen Ergebnisse (Kap. 2.2) liegen alle innerhalb der Nachweisgrenzen, wenn auch teilweise nahe an der unteren Nachweisgrenze.

6. Reagenzien

TCM-Puffer (Tris , Ca^{++} , Mg^{++})

Tris (25 mM), NaCl (120 mM), KCl (4 mM), MgCl_2 (1 mM), CaCl_2 (0,6 mM), pH 7,4. (Der pH ist temperaturabhängig und mußte für die verwendeten Temperaturen 4°C und 37°C eingestellt werden).

Anti-IgE-Serum

Humanes Anti-IgE-Serum R (Behringwerke AG, Marburg)
Antiserum gegen menschliches Immunglobulin E (E-Kette)
vom Kaninchen

Antikörpertiter: 492279 IU/ml

(verwendete Konzentration: ca. 500 IU/ml)

Indomethacin

Sharp & Dohme GmbH München

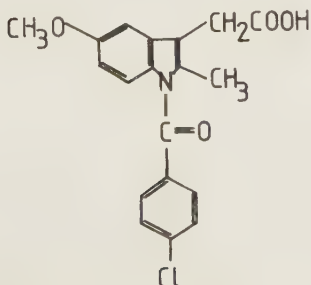


Abb. 2

Indomethacin ist kaum wasserlöslich (nur bei hohem pH). Es wurde deshalb in einem Tropfen Äthanol gelöst, etwas NaOH (2N) dazugegeben und vorsichtig von ca. pH 9 auf pH 7,8 mit HCl (1N) heruntertitriert.

Prostaglandin E₂

Prostaglandin E₂^R, Sigma München

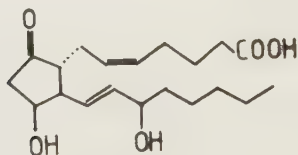


Abb. 3

Acetylsalicylsäure (Aspirin)

Aspisol^R

Acetylsalicylsäure (ASA) acetyliert das Enzym Zyklooxygenase und inhibiert es somit irreversibel (111).

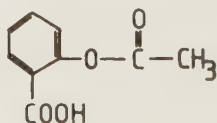


Abb. 4

Ficoll-Hypaque

Ficoll-PaqueTM, Pharmacia Fine Chemicals

100 ml enthalten: Ficoll 400 (5,7 g)

Diatrizoatnatrium (9,0 g)

Glutathion GSH

L-Glutathion reduziert^R (Serva, Heidelberg)

Das Tripeptid Glutathion besteht aus den drei Aminosäuren Glutamat, Glycin und Cystein; seine Funktion wird vor allem durch die SH-Gruppe des Cystein bestimmt. Sie soll die SH-Gruppen anderer Enzyme vor Oxidation schützen und wirkt bei vielen Reaktionen als Coenzym (z. B. Coenzym der PGE₂-Isomerase). Das GSH geht dabei in seine oxidierte Form GSSG über.

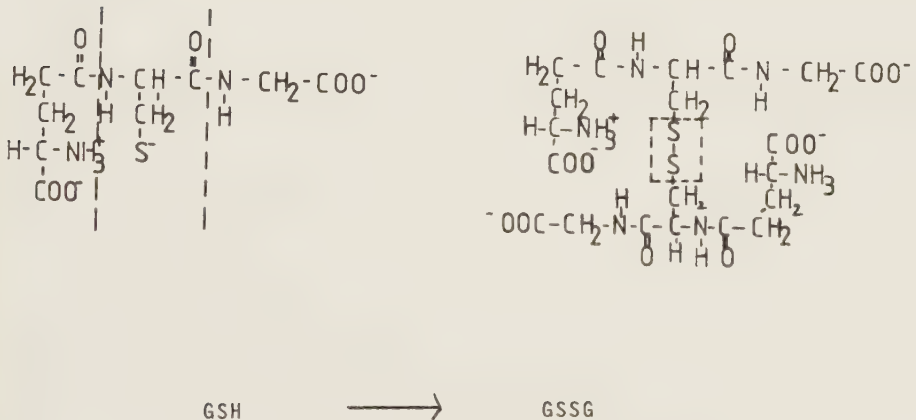


Abb. 5

7. Statistische Methoden

Mittelwertbestimmung:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Berechnung der Standardabweichung:

$$s_n = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n}}$$

Zur Signifikanzbestimmung wurde der Student t-Test für verbundene Stichproben verwendet.

C) Ergebnisse

1. Ergebnisse bei den Versuchen zur Methodologie

1.1 Auswahl eines geeigneten Stimulationsmittels.

Als Allergene wurden in einigen Vorversuchen Hauttest-Allergene (Prick-Test-Extrakte von Bencard und Allergo-pharma) in Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1000 verwendet; auf diese Weise kamen sehr verschiedene Substanzen zur Anwendung, je nachdem, wogegen die Allergie des Patienten gerichtet war. Wurden die Leukozyten eines Patienten mit verschiedenen Allergenen stimuliert, so ergaben sich z.T. Unterschiede in der Höhe der Histaminfreisetzung bei den verschiedenen Allergenen.

Außerdem waren die Histaminwerte nach Allergenstimulierung teilweise höher als der Gesamtgehalt an Histamin.

Im folgenden sind die Histaminwerte einiger Vorversuche tabellarisch dargestellt:

Histamingehalt im Zellüberstand in ng/ml

Pat.Nr.	Allergen	Leerwert	Allergen in Verdünnung			100 %-Wert
		(vor Stimulation)	1:10	1:100	1:1000	
36	Roggen	1,8	8,8	4,8	2,5	7,9
37	Gräser	0,5	5,5	1,9	0,9	5,5
38	Hausstaubmilbe	2,7	3,4	3,2	3,2	10,8
39	"-	1,1	14,1	7,8	4,4	18,0
40	Roggen	2,3	--	--	9,1	5,9
Kontrollperson						
	Roggen	0,6	12,9	3,0	0,9	10,0
"	"-	0,4	20,4	4,0	0,6	7,4
"	"-	0,7	204,8	51,2	11,5	10,5

Tabelle 3

Die von Autoanalyser gemessenen Werte nach Allergenstimulation sind z. T. höher als der 100 %-Wert (u. a. bei Roggenallergen).

Die Testung einzelner Allergen-Extrakte auf Eigenfluoreszenz im Autoanalyser ergab folgende Werte:

Getestet wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung.

Roggen (Allergopharma):	28,8 ng/ml
Roggen (Bencard) :	400,0 ng/ml
Gräser (Bencard) :	3,6 ng/ml
Bienenqift (Pharmacia):	8,0 ng/ml

Es zeigte sich besonders bei Roggen eine starke Eigenfluoreszenz.

Mehrere Gründe sprachen also dafür, die Kinetik-Versuche mit nur einer Substanz durchzuführen:

- ein Teil dieser "natürlichen" Allergene zeigte bei der fluorometrischen Histaminmessung eine beträchtliche Eigenfluoreszenz und verfälschte somit das Ergebnis (siehe Tab. 3)
- die meisten Atopiker haben eine Allergie gegen mehrere Stoffe; aus Vergleichsgründen hätte aber nur jeweils ein Allergen verwendet werden können
- mit welchem Allergen sollten die Leukozyten der "Normalpersonen" stimuliert werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten?

Aus diesen Gründen wurde bei allen Kinetik-Versuchen eine 1:1000-Verdünnung eines Anti-IgE-Präparates benützt (Behring).

1.2 Stimulation von Leukozyten nach Ficoll-Isolierung

Zur Anreicherung von Granulozyten wurden bei einem Teil der Versuche die Lymphozyten mittels Ficoll 400 abgetrennt. Nach Studium der Literatur ergab sich folgendes Problem: Ficoll-Hypaque enthält die Substanz Natriumdiatrizoat, eine Substanz, die die basophilen Leukozyten degranuliert (67).

In Kontrollversuchen wurden Leukozyten mit unverdünntem Ficoll-Hypaque "stimuliert":

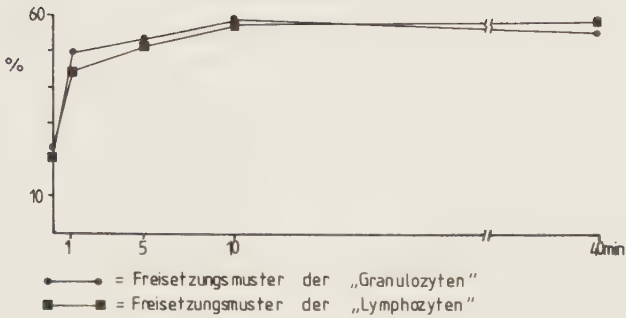
Eine leichte Degranulation erfolgte nur bei 37° C; bei Zimmertemperatur oder 4° C wurde kein Histamin freigesetzt, d.h., die freigesetzte Histaminmenge lag nicht über dem Leerwert.

Das gleiche Ergebnis brachte im übrigen ein parallel durchgeführter Versuch mit Dextran 6 %. Da bei der Aufarbeitung der Leukozyten nur bei einer Temperatur von 4°C Kontakt mit Ficoll-Hypaque bestand, konnte dieses Problem also vernachlässigt werden.

Es tauchte jedoch ein weiteres Phänomen auf:

Bei einem der Versuche wurden zur Kontrolle auch die Lymphozyten stimuliert, die ich ja in dem isolierten Lymphozytenring gewann; diese "Lymphozyten" zeigten das gleiche Freisetzungsmuster wie die Granulozyten (Graphik 1). Das bedeutete, daß sich auch im Lymphozytenring basophile Granulozyten befanden.

Ein nach Pappenheim gefärbtes Ausstrichpräparat bestätigte dies.



% = Prozent des Gesamtgehalts an Histamin

Abb. 6: Vergleich der Histaminfreisetzung des "Lymphozytenrings" und der Granulozyten nach Stimulation mit Anti-IgE bei einem der Atopiker. Wegen der großen Ähnlichkeit im Freisetzungsverhalten wurde auf eine Abtrennung der Lymphozyten durch Ficoll-Hypaque verzichtet.

1.3 Versuche zur Spezifität der Histaminmessung

Alle Substanzen, die bei der Isolierung der Leukozyten verwendet wurden (Ficoll-Hypaque, Dextran 6 %), sowie alle Substanzen, mit denen die Leukozyten präinkubiert wurden (Indomethacin, PGE_2 , ASA, GSH) wurden in verschiedenen Konzentrationen im Autoanalyzer auf ihre Eigenfluoreszenz hin getestet, ebenso das Anti-IgE-Präparat.

- Ficoll-Hypaque und Dextran 6 % zeigten im Autoanalyzer keinen Ausschlag.
- Prostaglandin E_2 , Acetylsalicylsäure und Anti-IgE ergaben ebenfalls keinen Ausschlag.
- Indomethacin besaß bei der flourometrischen Histaminmessung im Autoanalyzer eine geringe Eigenfluoreszenz ab einer Konzentration von $2 \times 10^{-4} \text{ M}$; bei der von mir verwendeten Endkonzentration von 10^{-5} M ergab sich kein Ausschlag.
- Glutathion zeigte eine starke Eigenfluoreszenz; die Histaminwerte der Glutathion-Versuche konnten deshalb nicht ausgewertet werden.

Jedoch konnte bei der Anreicherung der Zellen mit GSH die membranstabilisierende Wirkung des GSH bereits während der Sedimentation sehr deutlich beobachtet werden: Während der Sedimentation trat in der Regel eine leichte Hämolyse und damit eine Rosaverfärbung des Überstandes auf. Bei dem mit GSH angereicherten Blut war das Plasma makroskopisch ohne jede Verfärbung.

1.4 Versuche zur Spezifität der Prostaglandin E_2 -Bestimmung

Alle verwendeten Substanzen wurden mit dem PGE_2 -RIA getestet. Lediglich Indomethacin zeigte leicht positive Werte (auch in der von mir verwendeten Konzentration). Eine chromatographische Kontrolle der hohen PGE_2 -Werte nach Stimulation der Leukozyten ergab jedoch, daß auch die tatsächliche Konzentration von PGE_2 im Zellüberstand nach Präinkubation mit Indomethacin und Stimulation mit Anti-IgE sehr hoch war; trotzdem habe ich auf eine Auswertung der PGE_2 -Werte der "Indomethacin"-Versuche wegen der Unsicherheit der tatsächlichen PGE_2 -Werte verzichtet.

Versuche einer Kreuzreaktion von PGD_2 mit PGE_2 ergaben, daß im relevanten Bereich von 5 - 50 pg/100 μ l PGE_2 eine um den Faktor 10^3 - 10^4 höhere PGD_2 -Konzentration nötig wäre, um ein falsch positives Resultat zu ergeben:

PGD_2 ng/100 μ l	PGE_2 ng/100 μ l
0.05	0.00012
0.5	0.00025
5.0	0.00090
50.0	0.00690
500.0	0.03012

Tabelle 4

Zur Kontrolle der Spezifität der PGE_2 -Messung wurden verschiedene Konzentrationen von PGD_2 (linke Spalte) mit dem PGE_2 -Radioimmunoassay getestet.

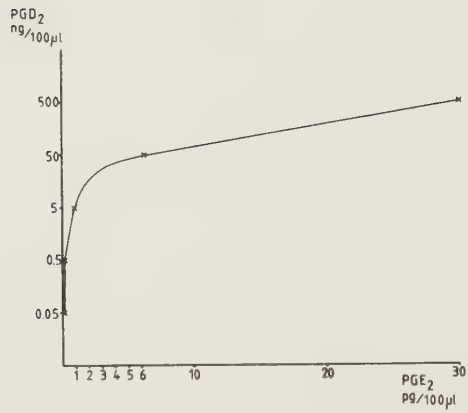


Abb. 7: Testung von PGD₂ mittels PGE₂-RIA
Erst im Bereich von 5 - 50 ng/100µl PGD₂
ergibt der PGE₂-RIA ein falsch positives
Ergebnis (im Bereich von wenigen Picogramm)

2. Ergebnisse der Stimulationsversuche mit Anti-IgE

2.1 Histaminfreisetzung

2.1.1 Unterschiede im Gesamtgehalt an Histamin und in der spontanen Histaminfreisetzung bei Atopikern und der Kontrollgruppe

Der Gesamtgehalt an Histamin wurde durch Lysieren der Leukozyten mit Perchlorsäure bestimmt. Von 28 Personen waren 13 Atopiker und 15 Nicht-Atopiker.

Histamin- gehalt	ng/10 ⁶ Leuko- zyten Atopiker	ng/10 ⁶ Leuko- zyten Nicht-Atopiker
	35,0	47,2
	1,4	28,9
	5,9	54,7
	12,3	38,3
	7,5	49,8
	6,7	68,6
	14,3	14,6
		17,0
		11,4
	24,3	12,8
	8,7	4,2
	7,2	23,9
	10,0	5,6
		31,1
	18,4	16,7

$\bar{x}$ = 12,6 ± 8,9 25,5 ± 21,4

Tabelle 5

Bei starken individuellen Schwankungen ergab sich für die Nicht-Atopiker ein signifikant ($p < 0,05$) höherer Wert als für die Atopiker.

Die basale Sekretion (Spontanrelease) wurde in % des Gesamtgehalts bestimmt und aus insgesamt 39 Kinetik-Versuchen errechnet; davon waren 29 Atopiker und 10 Nicht-Atopiker.

Spontanrelease der Atopiker: 18,1 % - 11,2 %
(n = 29)

Spontanrelease der Kontrollgruppe: 13,5 % $\pm$ 7,2 %
(n = 10)

Während der Gesamtgehalt an Histamin bei den Atopikern geringer war, ergab sich bei der Berechnung der basalen Sekretion im Durchschnitt eine etwas höhere Sekretionsleistung (statistisch nicht signifikant).

2.1.2 Kinetik der Histaminfreisetzung

Der zeitliche Ablauf der Freisetzung von Histamin wird in der folgenden Zeichnung dargestellt:

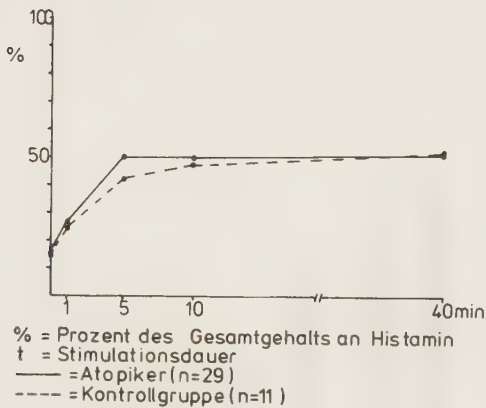


Abb. 8: Kinetik der Histaminfreisetzung
Vergleich zwischen Atopikern und Kontrollgruppe

Wie schon bei der basalen Sekretion setzen die Atopiker 5 min nach der Stimulation ca. 20 - 30 % mehr Histamin frei als die Kontrollgruppe; wegen der erheblichen individuellen Schwankungen ist eine Vorhersage über die Höhe der Freisetzung jedoch nicht möglich. Bei 40-minütiger Stimulationsdauer zeigt sich im Durchschnitt kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die basophilen Leukozyten sezernierten nach der Stimulation mit Anti-IgE das in ihnen gespeicherte Histamin im wesentlichen innerhalb der ersten 5 Minuten: es werden dabei nicht die gesamten Speicher entleert, sondern nur etwa die Hälfte sezerniert.

Die Gruppe der Atopiker ($n = 29$) zeigte eine etwas schnellere Histaminfreisetzung als die Kontrollgruppe ($n = 11$). Der Unterschied nach 5 min Stimulationsdauer (Graphik 4, III und IV) war statistisch signifikant ($p < 0,02$).

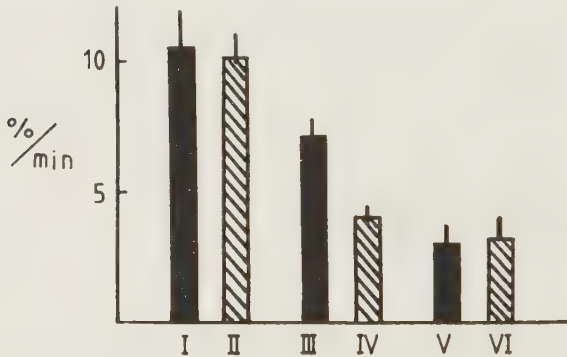


Abb. 9: Geschwindigkeit der Histaminfreisetzung während der ersten 10 Minuten nach Stimulation mit Anti-IgE

Freisetzung pro Minute

- I während der ersten Minute (Atopiker)
- II während der ersten Minute (Kontrolle)
- III während der ersten 5 Minuten (Atopiker)
- IV während der ersten 5 Minuten (Kontrolle)
- V während der ersten 10 Minuten (Atopiker)
- VI während der ersten 10 Minuten (Kontrolle)

Nur nach einer Stimulationsdauer von 5 Minuten zeigte sich bei den Atopikern ($n = 29$) eine signifikant ($p < 0,02$) höhere Histaminfreisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n = 11$).

2.1.3 Einfluß verschiedener Substanzen auf die Histaminfreisetzung

2.1.3.1 Erhöhung der Histaminfreisetzung durch Indomethacin (10^{-5} M).

Von 23 Kinetik-Versuchen mit Indomethacin waren 18 Atopiker und 5 Kontrollpersonen. In der folgenden Zeichnung sind die Durchschnittswerte aller 23 Indomethacin-Versuche dargestellt.

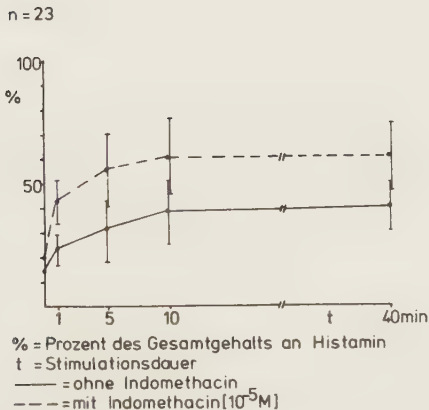


Abb. 10: Vergleich der Histaminfreisetzung mit und ohne Indomethacin (10^{-5} M)
Indomethacin führte in allen Versuchen zu einer Erhöhung der Histaminfreisetzung nach Stimulation der Leukozyten mit Anti-IgE.

Bereits die basale Histaminfreisetzung wird um durchschnittlich 5 % des Gesamtgehalts erhöht (dies bedeutet eine relative Erhöhung um 26 %).

Hier die prozentuale Erhöhung der Histaminfreisetzung durch Indomethacin im Durchschnitt (n = 23)

nach	Erhöhung um
0 min	26 %
1 min	100 %
5 min	64 %
10 min	51 %
40 min	42 %

Tabelle 6

Im folgenden ist die Steigerung der Histaminfreisetzung graphisch dargestellt:

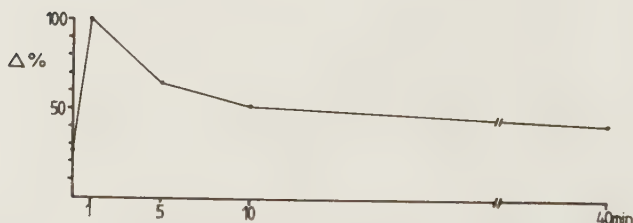


Abb. 11: Darstellung der prozentualen relativen Erhöhung der Histaminfreisetzung durch Indomethacin in Abhängigkeit der Freisetzung ohne Indomethacin. Am stärksten zeigt sich die Indomethacinwirkung nach 1 Minute (Erhöhung um 100%) und fällt innerhalb der ersten 10 Minuten auf die Hälfte zurück.

Im folgenden ist die Erhöhung der Histaminfreisetzung nach Atopikern ($n = 18$) und gesunden Personen ($n = 5$) getrennt dargestellt:

I Atopiker ($n = 18$)

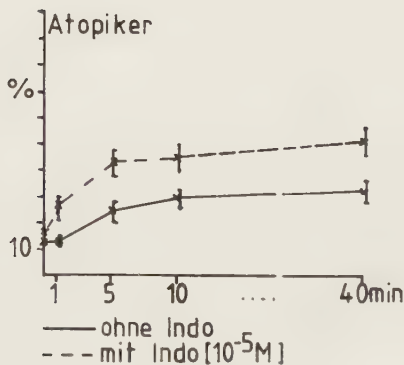


Abb. 12: Darstellung des Verlaufs der Indomethacin-Wirkung bei 18 Atopikern.
Indomethacin erhöhte zu allen gemessenen Zeiten signifikant die Histaminfreisetzung nach Stimulation der Leukozyten mit Anti-IgE ($p < 0,01$).

II Kontrollen (5)

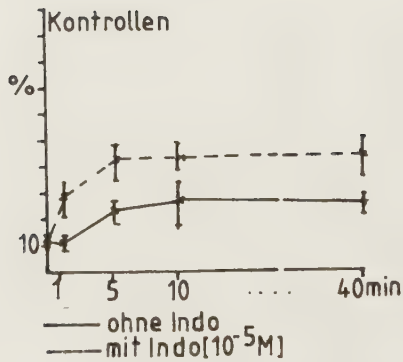


Abb. 13: Darstellung des Verlaufs der Indomethacin-Wirkung bei 5 Kontrollpersonen. Indomethacin erhöhte zu allen gemessenen Zeiten signifikant die Histaminfreisetzung ($p < 0,01$); ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu den Atopikern (Abb. 12) ist nicht zu erkennen.

2.1.3.2 Steigerung der Histaminfreisetzung durch Acetylsalicylsäure (10^{-5}M)

In einer Konzentration von 10^{-5}M erhöhte Acetylsalicylsäure (ASA) die Histaminfreisetzung in allen 4 durchgeführten Versuchen.

Im folgenden sind die 4 Versuche einzeln graphisch dargestellt (2 Atopiker, 2 Normalpersonen):

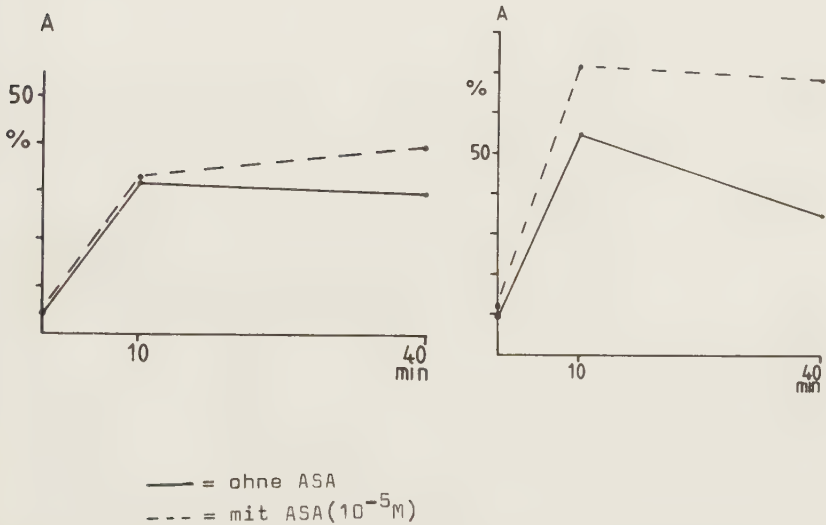


Abb. 14,15: Einzeldarstellung von 2 Versuchen mit ASA (10^{-5}M) bei 2 Atopikern (links Pat. Nr. 34, rechts Pat. Nr. 35 von Tabelle 1)
Messung nach 10 min und 40 min Reaktionsdauer
Durch Acetylsalicylsäure wird die Histaminfreisetzung basophiler Leukozyten deutlich erhöht.

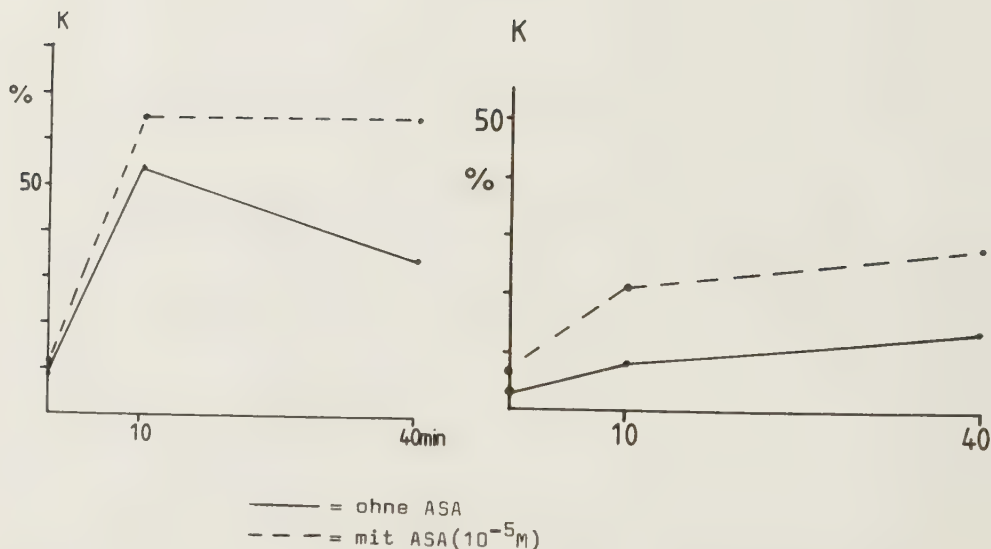


Abb. 16, 17: Einzeldarstellung des Histamingehalts von 2 Versuchen mit ASA ($10^{-5} M$) bei 2 Kontrollpersonen. Messung nach 10 min und 40 min Reaktionsdauer. Acetylsalicylsäure erhöhte (wie bei den Atopikern) die prozentuale Histaminfreisetzung. Ein klarer Unterschied in Verlauf und Höhe der Freisetzungsteigerung zwischen Atopikern und den Kontrollpersonen ist nicht zu erkennen.

Hier die prozentuale Erhöhung des Histaminrelease durch Acetylsalicylsäure im Durchschnitt ($n = 4$)

nach	Erhöhung um
0 min (LW)	34 %
10 min	47 %
40 min	79 %

Tabelle 7

Die prozentuale Erhöhung der Histaminfreisetzung nahm im Laufe der Reaktion bei Acetylsalicylsäure zu, während sie bei Indomethacin kleiner wurde (2.1.3.1)

2.1.3.3 Verminderung der Histaminfreisetzung durch Prostaglandin E_2

Von 16 Kinetik-Versuchen waren 11 Atopiker und 5 Kontrollpersonen. In der folgenden Zeichnung sind die Durchschnittswerte aller 16 Prostaglandin- E_2 -Versuche dargestellt.

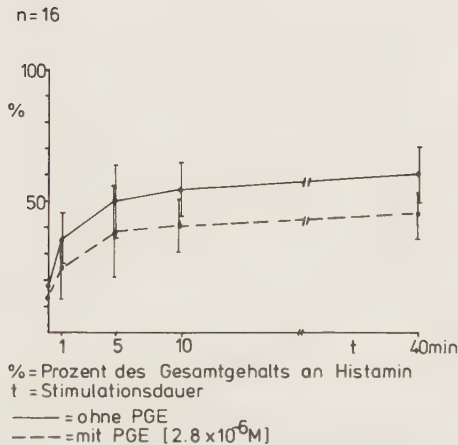


Abb. 18: Einfluß von PGE₂ auf die Histaminfreisetzung: PGE₂ ($2,8 \times 10^{-6} M$) hemmt zu allen gemessenen Zeiten die Histaminfreisetzung signifikant. ($p < 0,01$)

Die prozentuale Hemmung des Histaminrelease betrug durchschnittlich ($n = 16$):

nach	Hemmung um
0 min	27 %
1 min	29 %
5 min	28 %
10 min	33 %
40 min	32 %

Tabelle 8

Die Stärke der Freisetzungshemmung blieb während der gesamten Reaktionszeit im wesentlichen konstant; bereits vor der Stimulation mit Anti-IgE, also nach 10 min Präinkubation mit PGE_2 , wurde die spontane Histaminfreisetzung prozentual gesehen fast ebenso stark gehemmt wie nach der Stimulation. Diese - im Vergleich zum Gesamtgehalt an Histamin nur geringe Verminderung des Histaminrelease um ca. 5 % - war in 14 der 16 Versuche zu beobachten und statistisch signifikant (in 2 Fällen war die Freisetzung mit und ohne PGE_2 identisch).

Im folgenden ist die Verminderung der Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten nach Atopikern ($n = 11$) und gesunden Personen ($n = 5$) graphisch dargestellt:

I Atopiker (n = 11)

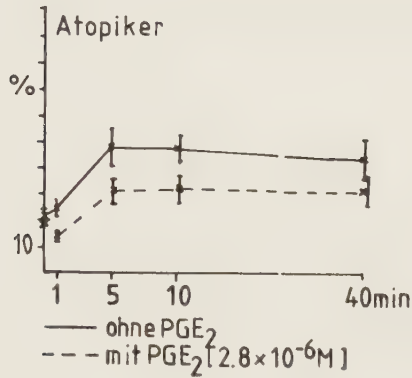


Abb. 19: Verlauf der Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten bei 11 Atopikern ohne und mit PGE₂ ($2,8 \times 10^{-6} \text{M}$). PGE₂ verringerte zu allen gemessenen Zeiten signifikant die Histaminfreisetzung ($p < 0,01$).

II Kontrollen (n = 5)

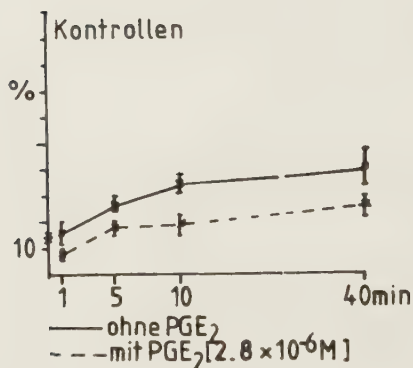


Abb. 20: Verlauf der Histaminfreisetzung bei 5 Kontrollpersonen ohne und mit PGE₂.

PGE₂ verminderte ebenfalls zu allen gemessenen Zeiten signifikant die Histaminfreisetzung ($p < 0,01$).

Zu den Zeiten 5 min und 10 min nach Stimulation zeigte sich im Vergleich zu den Atopikern ein signifikanter Unterschied: die Leukozyten der Atopiker reagierten stärker auf PGE₂, d.h. die Verminderung der Histaminfreisetzung durch PGE₂ war signifikant stärker (zum Zeitpunkt 5 min: $p < 0,02$, zum Zeitpunkt 10 min $p < 0,05$).

2.2 Prostaglandin E₂-Produktion nach Stimulation

2.2.1 Höhe und zeitlicher Verlauf des PGE₂-Gehalts im Zellüberstand nach Stimulation mit Anti-IgE

Von den 36 gemessenen Versuchsreihen waren insgesamt nur 10 auswertbar, da nur bei diesen alle Werte über der unteren Nachweisgrenze lagen.

I Atopiker (n = 6)

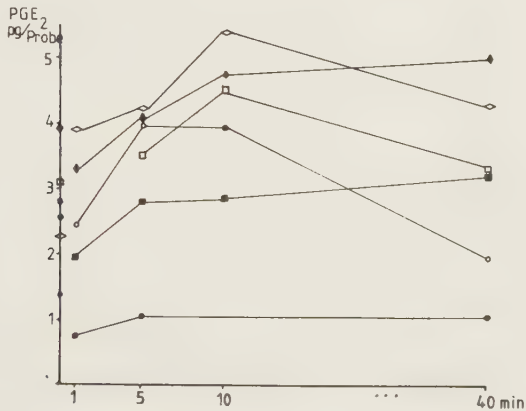


Abb. 21: Darstellung des Verlaufs der PGE₂-Konzentration im Zellüberstand nach Anti-IgE-Stimulation bei 6 Atopikern. Messungen nach 1, 5, 10 und 40 min. Die PGE₂-Konzentration ist in pg/Probe angegeben. 1 Probe sind 100 µl Zellüberstand. Höhe und Verlauf der PGE₂-Werte sind individuell sehr unterschiedlich.

Hier die Zuordnung der Symbole zu den Pat. Nr. aus Tabelle 1.

◇ = Nr. 27, ◆ = Nr. 43, ◦ = Nr. 9, □ = Nr. 10,
▪ = Nr. 42, • = Nr. 14.

II Kontrollgruppe (n = 4)

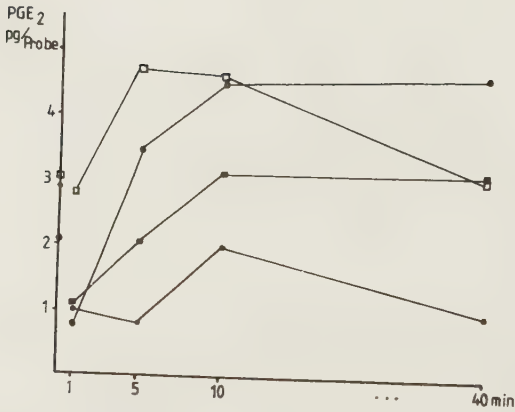


Abb. 22: Darstellung des Verlaufs der PGE_2 -Konzentration im Zellüberstand nach Anti-IgE-Stimulation bei 4 Kontrollpersonen. Messungen nach 1, 5, 10 und 40 min. Die PGE_2 -Konzentrationen sind in pg/Probe angegeben. 1 Probe sind 100 μl Zellüberstand. Im Vergleich zur Atopikergruppe zeigt sich kein wesentlicher Unterschied.

2.2.2 Einfluß verschiedener Substanzen auf die PGE_2 -Entstehung

2.2.2.1 Einfluß von Indomethacin (10^{-5}M)

Vorbehandlung der Zellen mit Indomethacin führte in fast allen ausgewerteten Versuchen zu wesentlich höheren PGE_2 -Werten als ohne Indomethacin-Präinkubation. Diese Erhöhung war bereits im Leerwert, also vor der Stimulation zu beobachten. Da Indomethacin in der verwendeten Konzentration einem positiven PGE_2 -Wert im RIA ergab, wurde auf eine Auswertung der Versuche verzichtet, obwohl eine chromatographische Untersuchung zeigte, daß auch eine tatsächliche PGE_2 -Erhöhung im Überstand der Leukozyten nach Indomethacin Inkubation vorlag.

2.2.2.2 Einfluß von Acetylsalicylsäure (10^{-5}M)

Von 4 Versuchen mit Acetylsalicylsäure (ASA) lagen 2 oberhalb der unteren Nachweisgrenze.

In diesen beiden Fällen (1 Atopiker und 1 Kontrollperson) führte ASA (10^{-5}M) zu einer Verminderung des PGE_2 -Gehalts im Leukozytenüberstand; diese Verminderung war bereits im Leerwert, also ohne Stimulation mit Anti-IgE, zu beobachten.

Im folgenden sind die beiden Versuche graphisch dargestellt:

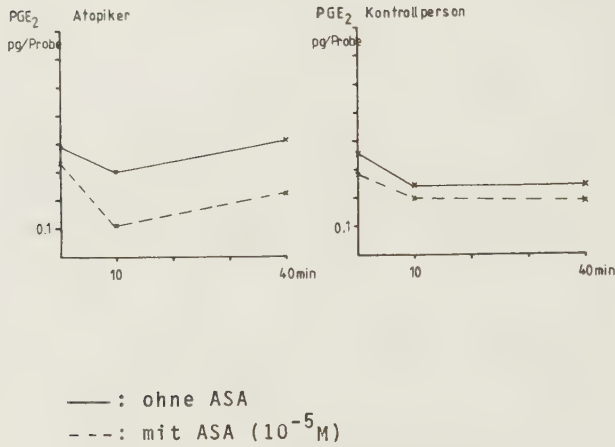


Abb. 23, 24: Darstellung des PGE₂-Gehalts im Zellüberstand nach Stimulation mit Anti-IgE (Einzeldarstellungen) mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit ASA
A: Atopiker (Pat. 34 aus Tabelle 1)
K: Kontrollperson

Die PGE₂-Konzentration ist in pg/Probe angegeben. 1 Probe sind 100 µl.
Acetylsalicylsäure führte in beiden Versuchen zu einer Verminderung der Prostaglandin E₂-Produktion.

2.2.2.3 Einfluß von Glutathion (GSH)

Bei 4 von 9 Versuchen mit GSH lagen die PGE_2 -Werte über der unteren Nachweisgrenze (2 Atopiker, 2 Kontrollpersonen) (Kapitel B, 3.4). Eine Vorbehandlung mit reduziertem Glutathion (GSH) führte zu einer deutlichen Erhöhung der PGE_2 -Produktion.

I Atopiker

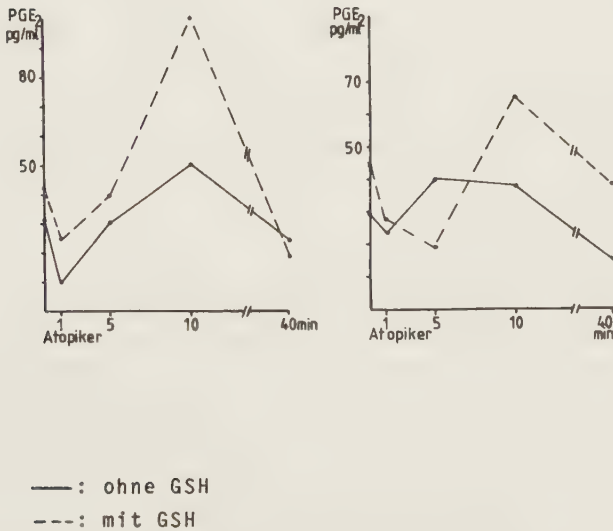


Abb. 25, 26: Darstellung der PGE_2 -Konzentration im Zellüberstand nach Anti-IgE-Stimulation mit und ohne Vorbehandlung mit GSH (2 Atopiker, Pat. Nr. 9, 10 aus Tab. 1)
GSH führte zu einer deutlichen Erhöhung der PGE_2 -Konzentration, vor allem nach einer Stimulationsdauer von 10 min.

II Kontrollpersonen

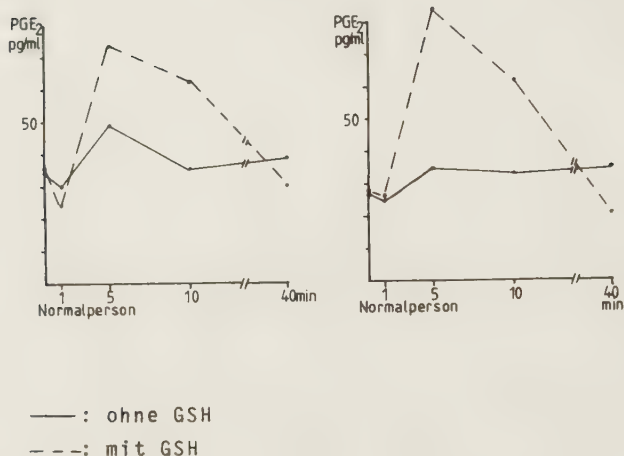


Abb. 27, 28: Darstellung der PGE_2 -Konzentration im Zellüberstand nach Stimulation mit Anti-IgE bei 2 gesunden Kontrollpersonen mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit GSH

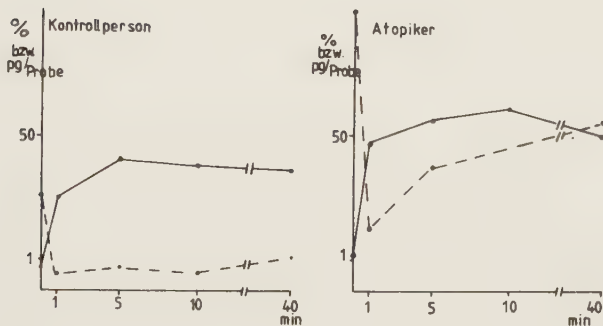
Auch bei den gesunden Probanden zeigte sich eine deutliche Mehrproduktion von PGE_2 durch GSH, allerdings war hier das Maximum der Mehrproduktion schon nach 5 min Stimulationsdauer erreicht (die PGE -Erhöhung durch GSH bei den Atopikern war "langsamer" (Abb. 21, 22)), während die Histaminfreisetzung "schneller" vor sich ging (höhere Geschwindigkeit in den ersten 5 min. im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 9)).

2.3 Vergleich zwischen Histaminfreisetzung und Prostaglandin- E_2 -Entstehung nach Stimulation mit Anti-IgE

Da die individuellen Schwankungen der PGE_2 -Produktion und der Histaminausschüttung recht groß sind, kann ein Vergleich nur individuell stattfinden.

2.3.1 Höhe und zeitlicher Verlauf

In der folgenden Abbildung sind 2 typische Einzelfälle dargestellt (1 Atopiker Pat. Nr. 12 aus Tab. 1, 1 Kontrollperson)



— = Histaminfreisetzung in % des Gesamtgehalts

--- = PGE_2 -Gehalt im Überstand in pg/Probe.

1 Probe sind 100 μ l Zellüberstand.

Abb. 29, 30: Vergleichende Darstellung der Histaminfreisetzung und der PGE_2 -Freisetzung nach Stimulation mit Anti-IgE; zeitlicher Verlauf, Messungen nach 1, 5, 10 und 40 min. Während die Histaminkonzentration im Zellüberstand nach 1 Minute bereits ein Vielfaches des Ausgangswertes beträgt, steigt die PGE_2 -Konzentration später und wesentlich schwächer.

2.3.2 Einfluß von Acetylsalicylsäure (ASA)

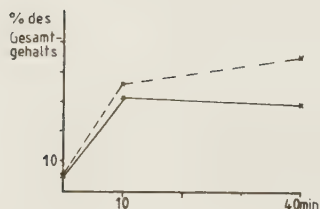
ASA führte in einer Konzentration von 10^{-5} M zu einer Hemmung der PGE_2 -Bildung (2.2.2.2) und zu einer konstanten Erhöhung der Histaminfreisetzung nach Stimulation (2.1.3.2).

Im folgenden sind 2 Versuche exemplarisch (1 Atopiker, 1 Kontrollperson) vergleichend dargestellt.

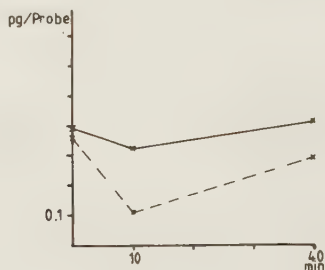
I Atopiker (Pat. Nr. 34, aus Tab. 1)

A) Histamin

B) PGE_2



— = ohne ASA
 --- = mit ASA (10^{-5} M)



— = ohne ASA
 --- = mit ASA (10^{-5} M)

Abb. 31, 32: Vergleichende Darstellung der Histaminfreisetzung und PGE_2 -Entstehung von Leukozyten nach Stimulation mit Anti-IgE bei einem Atopiker.

A): Histamin in % des Gesamtgehalts

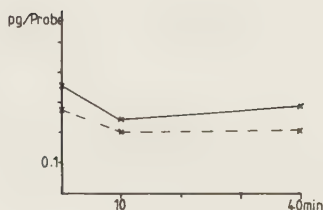
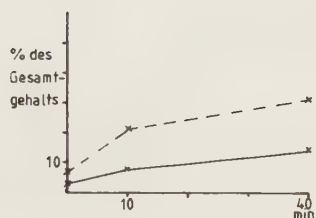
B): PGE_2 in pg/Probe (1 Probe ist 100 μl).

Während die PGE_2 -Konzentration schon nach 10 min stark durch ASA vermindert wurde, stieg die Histaminkonzentration erst später.

II Kontrollperson

A) Histamin

B) PGE_2



— = ohne ASA
 --- = mit ASA (10^{-5} M)

— = ohne ASA
 --- = mit ASA (10^{-5} M)

Abb. 33, 34: Vergleichende Darstellung der Histaminfreisetzung und PGE_2 -Entstehung von Leukozyten nach Stimulation mit Anti-IgE bei einer gesunden Kontrollperson

A): Histamin in % des Gesamtgehalts

B): PGE_2 in pg/Probe (1 Probe = 100 μl).

Die PGE_2 -Verminderung war bei diesem Versuch schwächer als beim vorhergehenden (Graphik 21,22), die relative Erhöhung der Histaminfreisetzung aber stärker.

2.4 Histaminspiegel nach wiederholter Stimulation

Wenn die Leukozyten 30 Minuten nach der Stimulation mit Anti-IgE erneut mit der gleichen Menge Anti-IgE stimuliert wurden, so ergaben sich in der Regel 10 Minuten nach der 2. Stimulation höhere Histaminwerte (siehe Tabellen 9, 10 und Abb. 31 - 34)

2.4.1 Doppelstimulation der mit Indomethacin vorbehandelten Leukozyten

Im folgenden sind die Durchschnittswerte der Histaminfreisetzung von 15 Atopikern und 5 Kontrollpersonen tabellarisch dargestellt, und zwar in % des Gesamtgehalts an Histamin:

Atopiker (n = 15)

	OHNE Indo	mit Indo
vor Stimulation	13,0 ⁺ 0,9	16,6 ⁺ 2,1
1 x stimuliert	29,9 ⁺ 3,0	49,5 ⁺ 4,8
2 x stimuliert	35,1 ⁺ 3,7	57,7 ⁺ 5,1

Kontrollen (n = 5)

	OHNE Indo	mit Indo
vor Stimulation	11,0 ⁺ 1,4	12,6 ⁺ 3,1
1 x stimuliert	26,6 ⁺ 7,4	43,2 ⁺ 5,0
2 x stimuliert	30,0 ⁺ 5,7	60,4 ⁺ 6,5

Tabelle 9

Im folgenden sind die Histaminwerte aus Tabelle 9 zur Verdeutlichung graphisch dargestellt.

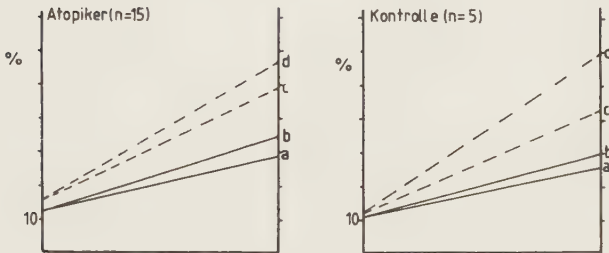


Abb. 35, 36: Durchschnittswerte der Histaminspiegel im Zellüberstand vor und nach ein-, bzw. zweimaliger Stimulation bei 15 Atopikern und 5 Kontrollpersonen
in % des Gesamtgehalts
a = 1 x stimuliert (0 Min)
b = 2 x stimuliert (0 Min, 30 Min)
c = 1 x stimuliert (0 Min) Indo ($10^{-5}M$)
d = 2 x stimuliert (0 Min, 30 Min) Indo ($10^{-5}M$)

gesamte Reaktionsdauer: 40 Minuten

Eine zweite Stimulation mit Anti-IgE führte zu einer weiteren Erhöhung der Histaminfreisetzung, die durch Indomethacin nicht wesentlich beeinflusst wurde.

2.4.2 Doppelstimulation der mit PGE_2 vorbehandelten Leukozyten

Die Durchschnittswerte der Histaminfreisetzung bei 11 Atopikern und 5 Kontrollpersonen in % des Gesamtgehalts an Histamin sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Atopiker (n = 11)		
	ohne PGE_2	mit PGE_2
<u>vor</u> Stimulation	21,0-3,4	20,5 ⁺ -3,4
1 x stimuliert	43,7 ⁺ -8,2	33,7 ⁺ -5,2
2 x stimuliert	49,1 ⁺ -8,8	32,5 ⁺ -5,1

Kontrollen (n = 5)		
	ohne PGE_2	mit PGE_2
<u>vor</u> Stimulation	16,9 ⁺ -3,0	16,5 ⁺ -3,2
1 x stimuliert	40,0 ⁺ -7,1	27,4 ⁺ -3,9
2 x stimuliert	37,0 ⁺ -3,8	24,5 ⁺ -2,9

Tabelle 10

Die in Tabelle 10 aufgeführten Histaminwerte sind in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt:

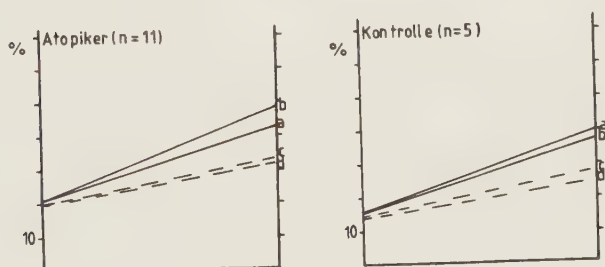


Abb. 37,38: Durchschnittswerte der Histaminspiegel im Zellüberstand vor und nach ein- bzw. zweimaliger Stimulation bei 11 Atopikern und 5 Kontrollpersonen

a = 1 x stimuliert (0 Min)

b = 2 x stimuliert (0 Min, 30 Min)

c = 1 x stimuliert (0 Min + PGE₂ ($2,8 \times 10^{-6}$ M.))

d = 2 x stimuliert (0 Min, 30 Min) +
PGE₂ ($2,8 \cdot 10^{-6}$ M)

gesamte Reaktionsdauer: 40 Minuten

Bei den Atopikern kam es bei der 2. Stimulation zu einer weiteren Histaminfreisetzung (b), bei den Kontrollen dagegen nicht.

PGE₂ verhinderte bei den Atopikern die erneute Histaminfreisetzung durch die 2. Stimulation (der Histamingehalt im Überstand hatte sich sogar etwas verringert (c → d), bei den Kontrollen war der PGE₂-Effekt ähnlich (ebenfalls Verringerung des Histamingehalts im Überstand).

D) Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten bei Atopikern und nichtatopischen Personen untersucht. Durch Kinetik-Versuche gelang es, den zeitlichen Verlauf der Histaminfreisetzung zu beobachten und Unterschiede in der Freisetzungsgeschwindigkeit zwischen den beiden Gruppen festzustellen.

Durch Beeinflussung des Arachidonsäuremetabolismus (Zyklo-oxygenasehemmung bzw. Zugabe von Prostaglandin E_2) wurde die Bedeutung der Arachidonsäureabkömmlinge für die Höhe der Histaminfreisetzung festgestellt; sie haben auch Einfluß auf die sog. "Releasability" der basophilen Leukozyten. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die basophilen Leukozyten der Atopiker z. T. anders auf die Zufuhr von Prostaglandin E_2 reagierten als die basophilen Leukozyten der Nichtatopiker.

Um die Freisetzungskapazität bzw. die Möglichkeit eines tachyphylaxieähnlichen Verhaltens der Leukozyten zu erkennen, wurden Doppelstimulationsversuche durchgeführt (im Abstand von 30 Min.) und dabei eine möglicherweise limitierende Wirkung von Prostaglandin E_2 festgestellt.

In einigen Versuchen konnte auch der Prostaglandin E_2 -Verlauf nach der Stimulation beobachtet werden.

In der folgenden Diskussion werden

- 1.) die Rolle der Prostaglandine bei der Histaminfreisetzung
- 2.) die Releasability bei Atopikern und gesunden Personen
- 3.) die Frage eines tachyphylaxieähnlichen Verhaltens der Leukozyten

anhand der vorliegenden Ergebnisse behandelt.

1. Die Rolle der Prostaglandine bei der Histaminfreisetzung

In Kapitel 2.1.3 wurden die Auswirkungen einer Hemmung der endogenen Prostaglandinsynthese, bzw. die Auswirkungen von exogen zugeführtem Prostaglandin E_2 auf die Histaminfreisetzung von basophilen Leukozyten gezeigt: die Hemmung (durch Indomethacin, Acetylsalicylsäure) führte zu einem signifikanten Anstieg der Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Anti-IgE, die Zufuhr von PGE_2 dagegen zu einer signifikant verminderten Freisetzung (zu allen gemessenen Zeiten nach der Stimulation).

Diese Ergebnisse lassen auf eine protektive Wirkung von Prostaglandin E_2 schließen.

Protektive Eigenschaften von Prostaglandinen wurden bereits mehrfach nachgewiesen, z. B. gegen die Entstehung von Aspirin-induzierten Ulcera des Magens (90).

Es stellen sich im wesentlichen nun die Fragen:

1. Ist pathobiochemisch tatsächlich der Prostaglandinmangel für die erhöhte Histaminfreisetzung verantwortlich oder wird durch die Zyklooxygenasehemmung der Arachidonsäureabbau zu den Leukotrienen begünstigt und sind diese Substanzen selbst verantwortlich für die erhöhte Histaminfreisetzung?
2. Die Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Anti-IgE umfaßt mehrere Schritte - an welcher Stelle greift PGE_2 (oder die Leukotriene) in die Regulation der Ausschüttung ein?

Ad 1)

In den letzten Jahren sind zahlreiche Arbeiten erschienen, die die Freisetzung von Histamin aus basophilen Leukozyten oder Mastzellen und den Metabolismus der Arachidonsäure in einen engen Zusammenhang bringen (7, 17, 23, 26, 30, 31, 32, 63, 45, 46, 69, 70, 75, 79, 102, 106).

Dieser Zusammenhang wurde noch verstärkt durch die Tatsache, daß zwei Mediatoren der allergischen Reaktion, nämlich die "slow reacting substance of anaphylaxis" (SRS-A) und der "eosinophil chemotactic factor" (ECF) selbst Produkte der Arachidonsäure sind und zu den Leukotrienen gehören (49, 73, 76). Die Leukotriene werden aus der Arachidonsäure über das Enzym Lipxygenase gebildet, während die Prostaglandine und Thromboxane über die Zyklooxygenase entstehen (20, 34, 91, 92).

Abb. 35 gibt einen schematischen Überblick über die beiden Wege des Arachidonsäuremetabolismus.

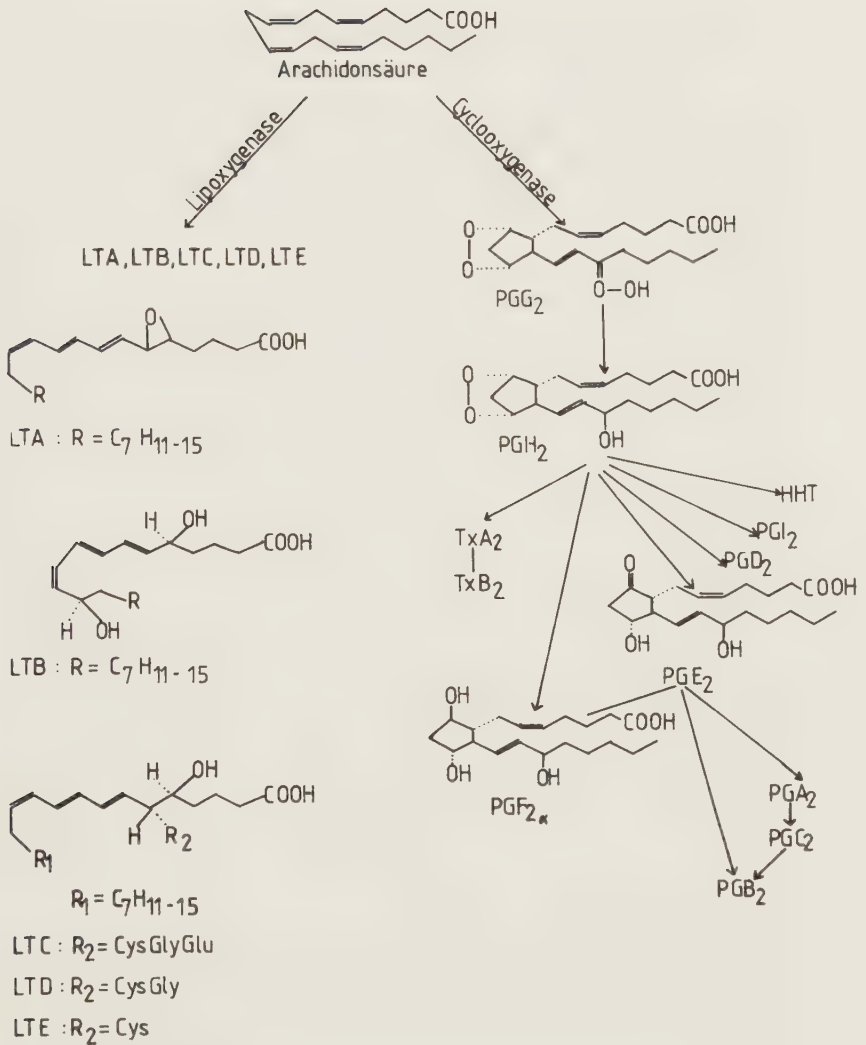


Abb. 35: Metabolismus der Arachidonsäure
Nach Samuelsson et al. (93) und Samuelsson & Hammarstroem (94).

Die Arachidonsäure selbst liegt normalerweise in nur sehr geringem Umfang frei in der Zellmembran vor; sie ist als (vierfach ungesättigte) Fettsäure Bestandteil der Membranphospholipide und wird von diesen durch das Enzym Phospholipase A_2 abgespalten. Wird nun die Zyloxygenase selektiv gehemmt, so ist zu erwarten, daß der Metabolismus nun in Richtung Leukotriene abläuft. Mit ETYA (eicosatetraynoic acid), einem Analogon der Arachidonsäure und Inhibitor der Phospholipase A_2 , ist es möglich, die Histaminfreisetzung dosisabhängig zu inhibieren (69), ebenso mit Mepacrin (ebenfalls ein Inhibitor der Phospholipase A_2).

Eine Hemmung der Zyloxygenase dagegen führt zu einer deutlichen Verstärkung der Histaminfreisetzung (Kap. 2.1.3.1 und 2.1.3.2); daraus ließe sich folgern, daß die Leukotriene die eigentlichen "Zwischenmediatoren" der Histaminfreisetzung sind. In der Tat wird heute dem Leukotrien C (SRS-A) eine zentrale Rolle beim allergischen Asthma bronchiale als Bronchokonstriktor zugeschrieben (4) - möglicherweise sogar beim sog. "aspirin-induced asthma" (108). Bestimmten Prostaglandinen käme dann eine protektive Funktion zu. Wenn auch die Prostaglandine z. T. antagonistische Wirkungen haben (71), so scheinen sie doch für die Zellmembran eine eher schützende Wirkung zu haben. In der Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale werden heute sowohl Histamin (initiale Phase) als auch SRS-A als Mediatoren diskutiert (1). Im Falle der basophilen Leukozyten wird ebenfalls eine wichtige Rolle der Lipoxygenaseprodukte vermutet.

Peters et al. zeigten, daß das (wichtige) Lipoxygenaseprodukt 5-HETE exogen zugegeben bei Leukozyten nicht zu einem Anstieg der Histaminfreisetzung nach Anti-IgE-Stimulation führt (82), doch ist dies noch kein Beweis, daß ein "shift" zu den Lipoxygenaseprodukten für die Erhöhung der Histaminfreisetzung durch Cyclooxygenasehemmung etwa keine Rolle spielt: Es können z. B. andere Lipoxygenaseprodukte wichtiger sein; außerdem muß ein exogen zugeführter Stoff nicht unbedingt

die gleiche Wirkung entfalten wie die endogen gebildete Substanz (Frage der Lokalisation, Konzentration usw.). Dafür, daß nicht allein der Prostaglandin E-Mangel für die erhöhte Histaminfreisetzung verantwortlich ist, sprechen die Ergebnisse der Prostaglandinbestimmung im Zellüberstand nach Indomethacin-Vorbehandlung und Stimulation mit Anti-IgE (2.2.2.1). Zwar konnte die Höhe der PGE_2 -Spiegel nicht genau quantifiziert werden, doch wurde eine generelle Erhöhung der PGE_2 -Werte chromatographisch nachgewiesen. Ob auch PGD_2 , das Hauptprodukt der Zyklooxygenase bei Mastzellen, erhöht war, ist aus den vorhandenen Ergebnissen nicht zu erschließen. Das Zustandekommen von erhöhten PGE_2 -Werten trotz Zyklooxygenasehemmung ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß Indomethacin als Radikalfänger wirkt und so die Hydroxylierung der Arachidonsäure über freie Radikale verhindert (HPETE, HETE - Bildung über freie Radikale verhindert). Jedoch ist die PGE_2 -Erhöhung (Konzentration im Bereich von 10^{-9}M) keinesfalls mit der PGE_2 -Konzentration zu vergleichen, die bei den in Kap 8) 3.2 beschriebenen Versuchen eingesetzt wurde (10^{-6}M). Die Konzentration an PGE_2 , die für eine Hemmung der Histaminfreisetzung notwendig wäre, wurde entweder nicht erreicht oder aber die PGE_2 -Entstehung fand am "falschen" Ort (z. B. in den anderen Leukozyten, die ja ca. 99 % des Leukozytengemisches ausmachen) oder zum falschen Zeitpunkt (z. B. zu spät) statt.

Hier ist im übrigen ein weiterer Punkt angesprochen, der den direkten Vergleich von Histamin- und Prostaglandingehalt im Zellüberstand nach Stimulation erschwert: Histamin enthalten im peripheren Blut nur die basophilen Leukozyten; die Arachidonsäure und die sie metabolisierenden Enzyme dagegen sind Membranbestandteile fast jeder Zelle; so lassen sich zwar die Änderungen des Histamingehalts im Überstand eindeutig den Basophilen zuordnen, der Prostaglandingehalt dagegen kann auch von anderen Zellen mitbestimmt sein (zudem befinden sich die aus der Arachidonsäure gebildeten Substanzen nicht unbedingt im Zellüberstand, sondern an den Zellmembranen).

Nach Anreicherung der Zellen mit reduziertem Glutathion, das im Arachidonsäureabbau ein Coenzym der PGE_2 -Isomerase darstellt, findet sich ebenfalls eine deutliche PGE_2 -Erhöhung (Kap. C, 2.2.2.3). Leider waren die Histaminwerte dieser Versuche wegen der hohen Eigenfluoreszenz von GSH im Autoanalyser nicht bestimmbar - gerade hier wären sie wohl sehr aufschlußreich gewesen, da hier die reine, endogene PGE_2 -Erhöhung (ohne Cyclooxygenasehemmung) und ohne "shift" zu den Lipoxygenaseprodukten) vorlag. Der zeitliche Unterschied zwischen Atopikern und Kontrollen in der GSH-Wirkung auf die Prostaglandinentstehung wird im zweiten Teil der Diskussion behandelt.

Ad 2)

(Frage nach dem Mechanismus der Prostaglandinwirkung)

Histamin liegt in den Mastzellen und in den Basophilen nicht frei vor, sondern ist zu 20 % an Heparin bzw. an das analoge Dermatansulfat gebunden, das als sehr saure Substanz die "Basophilie" bewirkt. Das gebundene Histamin steht für die Exkretion nicht zur Verfügung. Neben der IgE-vermittelten ("Brückenbildung") allergischen Reaktion können auch Substanzen zu einer Degranulation führen, die eine starke Affinität zu Heparin haben (z. B. Compound 48/80) (24, 76) oder die einen Calcium-Einstrom in die Zelle bewirken, sowie zahlreiche "direkte Liberatoren" (Opiate, Kontrastmittel etc.) (86).

Der Mechanismus der Histaminfreisetzung durch die Brückenbildung von zwei IgE-Molekülen und die daraus resultierenden intrazellulären Veränderungen sind seit einigen Jahren der Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (19, 28, 35, 40, 41, 42, 43, 44, 64, 77, 78, 96, 99).

Dabei wurden vor allem die Phospholipide (aus denen ja die Arachidonsäure und deren Produkte entstehen) beobachtet. Neben dem Calcium-Einstrom in die Zelle ist der beginnende Metabolismus der Phospholipide das erste, was der IgE-Brückenbildung folgt (15, 26, 37, 59, 95). Die aus der Methylierung der Phospholipide resultierende Verminderung der Membranviskosität (36, 37) könnte auch die Ursache für eine veränderte Permeabilität sein, zumal die Methylierung der Phospholipide dem Calcium-Einstrom vorausgeht. F. Hirata und J. Axelrod berichten in diesem Zusammenhang über Untersuchungen an HeLa-Zellen (39), bei denen die Zahl der β -adrenergen Rezeptoren durch eine Hemmung der Phospholipidmethylierung stark reduziert wurde, so daß sie davon ausgingen, daß die Konformationsänderung (durch Methylierung bedingt) eine Freilegung von Rezeptoren zur Folge haben kann.

Ring et al. (88) zeigten an 10 Atopikern und 7 gesunden Personen, daß die Leukozyten der Atopiker einen signifikant schwächeren cAMP-Anstieg nach β -adrenerger Stimulation hatten, als die der gesunden Probanden; die Frage, ob dies auf eine reduzierte Rezeptorenzahl zurückzuführen ist, wird damit nicht beantwortet, ein Zusammenhang zwischen Antwort auf Rezeptorstimulation und Methylierungszustand der Membranphospholipide ist aber gut vorstellbar.

Eine Hemmung der Methyltransferase (die die Phospholipide methyliert) oder eine Hemmung der Phospholipase A_2 (die aus den Phospholipiden die Arachidonsäure abspaltet) führen zu einer Hemmung der Histaminfreisetzung (39, 69). So können z. B. Glucocorticoide als Hemmer der Phospholipase A_2 die durch Leukotriene hervorgerufenen Hauteffekte (vasculäre Permeabilitätserhöhung) antagonisieren (103); möglicherweise beruht die inhibitorische Wirkung auf dem Vorhandensein eines endogenen Inhibitors, der durch die Glucocorticoide stimuliert wird (38). Die calciumabhängige Phospholipase A_2 kann durch niedrige Dosen Indomethacin gehemmt werden (10^{-9} M) (56).

Calcium- und c-AMP-abhängige Proteinkinasevorgänge spielen bei der Histaminfreisetzung ebenfalls eine Rolle (97) und können z. T. durch Indomethacin inhibiert werden (55).

Schließlich sind die Phospholipide wesentlich bei der Exozytose der histaminhaltigen Vesikel (32). Elektronenmikroskopische Studien zeigten deutlich, daß die äußere Zellmembran mit der Vesikelmembran verschmilzt; dabei spielen Ab- und Umbauprozesse an den Phospholipiden ab (60). Inwieweit Prostaglandine oder Leukotriene daran beteiligt sind, ist noch nicht geklärt.

Der Gehalt an intrazellulärem c-AMP spielt beim Mechanismus der Histaminfreisetzung eine wichtige Rolle (9, 10, 11, 14, 51, 53, 65, 68):

Ein hoher intrazellulärer c-AMP-Gehalt schützt die Zelle vor der Degranulation; da Atopiker einen schwächeren c-AMP-Anstieg nach β -adrenerger Stimulation zeigen, hat Szentivanyi seine Theorie von der " β -adrenergen Schwäche" entwickelt (107).

Die Prostaglandine beeinflussen ebenfalls die Menge und das Verhältnis der intrazellulären zyklischen Nukleotide (17, 71). So wurde von Mathé in der Lunge durch PGE_2 eine Zunahme an c-AMP, durch PGF_2 eine Zunahme an c-GMP festgestellt (71), Marone et al. zeigten, daß sich die durch β -adrenerge Stimulation hervorgerufenen c-AMP-Erhöhungen nicht durch Zyklusoxigenasehemmer blockieren lassen (69). Dies ist ein Hinweis mehr für einen eigenen PG-Rezeptor, der offensichtlich auch für Hormone eine wichtige Rolle spielen kann (62).

Offen bleibt die Frage, ob das bei der allergischen Sofortreaktion gebildete PGE_2 an der Nachbarzelle seinen membranstabilisierenden Effekt erzielt oder ob PGE_2 intrazellulär wirkt (sei es durch Stimulation der Adenylatzyklastase oder Änderung des Membranverhaltens). Die Ergebnisse der Histaminfreisetzungsversuche durch Stimulation mit Anti-IgE sprechen eher für eine intrazelluläre Wirkung, da die Histaminkonzentration im Zellüberstand schon in der ersten Minute nach der Stimulation sehr stark ansteigt, die PGE_2 -Konzentration jedoch erst später ansteigt, und sehr heterogen verläuft und somit primär nicht an einer anderen Zelle Einfluß auf die Histaminfreisetzung nehmen kann. Jedoch ist eine limitierende Wirkung -analog

den Versuchen mit exogen zugegebenem PGE_2 - durchaus denkbar. Insbesondere der langsamere PGE_2 -Anstieg bei den Glutathion-behandelten Zellen der Atopiker im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 21 - 24) und dagegen die schnellere Histaminfreisetzung der Atopiker in den ersten 5 Min. (Abb. 9) lassen an eine Limitierung der Histaminfreisetzung durch PGE_2 denken.

An welchem Punkt der Histaminfreisetzung PGE_2 eingreift, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht sicher entnommen werden. Noch kürzere Stimulationsintervalle (im Sekundenbereich) und Freisetzungsversuche mit anderen Liberatoren (z. B. "direkte" Liberatoren ohne Brückenbildung) könnten vielleicht darüber mehr Aufschluß geben. Entsprechende Untersuchungen laufen derzeit in unserem Labor (Dissertation, U. Walz).

Auch eine allgemeine Wirkung von Prostaglandinen auf die immunologische Konstellation ist beschrieben. Fischer et al. (27) zeigten - nachdem die Aktivierung von Maus-T-Suppressor-Lymphozyten durch PGE_2 bereits bekannt war (83 a) -, daß beim Menschen Monozyten durch Sekretion von PGE_2 zu einer Aktivierung der T-Suppressor-Lymphozyten führten. Eine T-Suppressor-Zell Schwäche, gefördert durch Histamin, das die rezeptor-tragenden T-Suppressor-Zellen inhibiert, ist nach Ring (89) eine Ursache für eine überschießende IgE-Produktion, die dann wiederum zur Histaminfreisetzung führt (circulus vitiosus). Eine Aktivierung der T-Suppressor-Zellen durch PGE_2 könnte diesem Mechanismus entgegenwirken. Aus den vorliegenden Versuchen kann diese Frage nicht entschieden werden, eher könnte eine Vergleichsstudie zwischen Atopikern und Gesunden bezüglich der Lymphozytenaktivierung durch PGE_2 weiteren Aufschluß geben.

Einen bemerkenswerten Hinweis auf die Wirkungsweise der Arachidonsäureabkömmlinge stellt das Ergebnis der spontanen Histaminfreisetzung nach Präinkubation, also ohne Stimulation mit Anti-IgE dar (siehe Kap. C, 2.1.3). Auch ohne spezifische Stimulation zeigte sich bei Zyklooxygenasehemmung

eine signifikante Erhöhung, durch PGE_2 -Zugabe eine signifikante Verminderung der Basalsekretion; der erste Schritt der Histaminfreisetzung durch Anti-IgE, nämlich die Brückenbildung, scheint also nicht der Angriffspunkt des PGE_2 zu sein. Diese Ergebnisse sind eher ein Hinweis für eine veränderte "Releasability", die neben der Zahl der IgE-Moleküle ein entscheidender Faktor für die Höhe der Histaminfreisetzung zu sein scheint (12, 13, 24, 29, 52, 66, 74).

Das z. T. unterschiedliche Freisetzungsverhalten zwischen Atopikern und gesunden Probanden nach Zugabe von PGE_2 wird im folgenden Kapitel ("Releasability" bei Atopikern und gesunden Personen) behandelt.

2. "Releasability" bei Atopikern und gesunden Personen

Die Höhe der Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Anti-IgE war bei Atopikern und bei der Kontrollgruppe im Durchschnitt etwa gleich.

Bei beiden Gruppen war die Freisetzung nach einer Stimulationsdauer von 10 min weitgehend abgeschlossen, der Histamingehalt im Zellüberstand änderte sich dann nur noch geringfügig. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch bei der Histaminmessung nach 5-minütiger Stimulationsdauer: die Histaminwerte lagen hier bei den Atopikern deutlich höher als bei der Kontrollgruppe (Abb. 9); da die 10-Minutenwerte wieder etwa gleich waren, spricht dieses Ergebnis für einen Unterschied in der Freisetzungsgeschwindigkeit in den ersten Minuten.

Als Ursachen für die langsamere Geschwindigkeit der Histaminfreisetzung des Nicht-Atopikers kommen in Betracht:

- 1) die geringere Anzahl der IgE-Moleküle auf der Basophilenmembran, die nach König (61) mit der Höhe des IgE-Spiegels im Serum eng korreliert,
- 2) die Besetzung der Histaminrezeptoren (6) auf der Basophilenmembran: eine Besetzung dieser Rezeptoren durch Histamin hat eine Hemmung der Histaminfreisetzung zur Folge; Ursache dieser Hemmung ist eine Erhöhung des intrazellulären c-AMP-Gehalts (51, 85, 104, 107, 112); diese Hemmung kommt möglicherweise bei den Nicht-Atopikern erst später zum Tragen als bei den Atopikern (wo es den max. Histaminrelease bei etwa 60 % beschränkt), da die Histaminfreisetzung in den ersten Minuten nicht die Höhe der Atopiker erreicht.

Über die Unterschiede im Freisetzungsverhalten wenige Minuten nach der Stimulation könnten evtl. mehrere Messungen innerhalb der ersten 10 Minuten genauere Informationen geben.

Auch häufigere PGE_2 -Bestimmungen während der Initialphase der Histaminfreisetzung könnten möglicherweise Auskunft darüber geben, ob Prostaglandine für die Geschwindigkeit der Freisetzung von Histamin eine Rolle spielen.

Indomethacin änderte zwar die Höhe der Freisetzung, aber kaum den zeitlichen Verlauf; es kam nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen Atopikern und der Kontrollgruppe.

Die Zugabe von PGE_2 dagegen führte bei den Atopikern 5 min und 10 min nach der Stimulation zu einer signifikant stärkeren Hemmung der Histaminfreisetzung im Vergleich zu den gesunden Probanden.

Daraus ließe sich eine erhöhte Ansprechbarkeit der "atopischen" Basophilen auf PGE_2 ableiten: da 5 min nach Stimulation die Basophilen der Atopiker auch signifikant mehr Histamin freigesetzt haben, ist ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Ergebnissen im Sinne eines erhöhten PGE_2 -Bedarfs, bzw. einer zu langsamen Wirkung des endogen gebildeten PGE_2 , denkbar.

Auf eine generell erhöhte "Releasability" bei Atopikern weist die etwas höhere Basalsekretion von Histamin sowie die höheren Freisetzungsraten in den einzelnen Versuchansätzen bei den Atopikern hin.

Auch bei den Prostaglandin E_2 -Spiegeln im Überstand zeigte sich kein eindeutiger Unterschied zwischen Atopikern und Normalpersonen (insgesamt starke individuelle Schwankungen). Lediglich die 4 Glutathion-Versuche (Abb. 21 - 24), die eine schnellere PGE_2 -Erhöhung durch Glutathion bei den Kontrollen ergaben, zeigten einen Unterschied: sie lassen an eine möglicherweise schneller einsetzende Prostaglandinbildung (und damit Schutz vor schneller Histaminfreisetzung) denken. Bedauerlicherweise fehlen hierzu, wie schon erwähnt, die dazugehörigen Histaminwerte (Eigenfluoreszenz von GSH).

Nach 1 - 5 min setzte in den meisten Versuchen ein Anstieg des PGE -Gehalts im Zellüberstand ein; es gab jedoch starke

individuelle Unterschiede. Daß tatsächlich nur PGE_2 gemessen wurde, bewies die Kreuzreaktion mit PGD_2 (Kap. 1.4). PGD_2 wird zwar (im Gegensatz zu den Mastzellen) von den Basophilen so gut wie nicht produziert und führt bei den Basophilen sogar zur Histaminfreisetzung (82 a), könnte aber von anderen Leukozyten produziert worden sein und die PGE_2 -Messung beeinflussen; dies ist, wie erwähnt, ausgeschlossen worden. Die Membranvorgänge bei der in vitro imitierten allergischen Sofortreaktion führten, wenn auch nicht genau quantifizierbar - zu einer Stimulation des Arachidonsäuremetabolismus und damit zur Stimulation der Zyklooxygenase. Diese Annahme wird von verschiedenen Autoren bestätigt (69, 70, 71, 75, 108, 109).

Wie aus Abb. 21 und 22 ersichtlich wird, besteht zwischen den Atopikern und der Kontrollgruppe kein wesentlicher Unterschied. Die prozentualen Schwankungen des PGE_2 -Gehalts im Überstand sind bei den Atopikern geringer (Schwankungen um durchschnittlich 56 %) als bei den Normalpersonen (Schwankungen um durchschnittlich 130 %). Dies könnte auf eine höhere Sensibilität des Zyklooxygenasesystems bei Normalpersonen hinweisen.

Die oben diskutierte erhöhte Ansprechbarkeit der Basophilen der Atopiker auf Zugabe von PGE_2 könnte diesen Hinweis bestätigen; dann würde eine geringere Sensibilität des Zyklooxygenasesystems bei Atopikern eine stärkere Reaktion auf PGE_2 (Hemmung der Histaminfreisetzung) verursachen (da andere Kontrollmechanismen möglicherweise schon voll ausgeschöpft sind, käme PGE_2 stärker zur Geltung).

Insgesamt gesehen könnte also in der Funktion des Zyklooxygenase- und auch des Lipoygenasesystems eine Ursache für die erhöhte Releasibility sein. Die Tatsache, daß die Suppressor-T-Zell-Schwäche der Atopiker möglicherweise u.a. auf einem PGE_2 -Mangel basiert, unterstützt diese Hypothese.

Das Phänomen der Tachyphylaxie

Eine wiederholte Stimulation der basophilen Leukozyten nach 30 Minuten änderte den Prostaglandin- und Histamingehalt im Überstand nach 40 Minuten nur unwesentlich. In den meisten Fällen lagen die Histaminwerte nach der Doppelstimulation höher als nach einer einfachen Stimulation (Abb. 35 - 38).

Allerdings wurden bei diesen Messungen aktuelle Veränderungen, die sich in den ersten Minuten nach der zweiten Stimulation möglicherweise ergaben, nicht erfaßt.

Dorsch et al. zeigten bei in vivo Versuchen am Meerschweinchen, daß Indomethacin die Entwicklung der Tachyphylaxie (16) bei wiederholten Allergen-Stimulationen verhinderte; die Beurteilung eines "Tachyphylaxie-ähnlichen" Verhaltens von Leukozyten ist im geschlossenen in vitro-System sehr erschwert, da die IgE- und auch die Histaminrezeptoren weitgehend besetzt sein dürften und die Substanzen nicht - wie in vivo - entfernt werden können. Nur ein völlig anderer Versuchsaufbau (mehrmaliges Stimulieren, Waschen der Zellen nach jeder Stimulation) könnte diese Probleme lösen. Doch auch dies dürfte schwierig sein, da z.B. mehrmaliges Waschen die Reagibilität der basophilen Leukozyten herabsetzt (35).

Die hier vorliegenden Ergebnisse ergeben keine Anhaltspunkte für ein prinzipiell unterschiedliches Freisetzungverhalten der basophilen Leukozyten von Atopikern und gesunden Personen nach wiederholter Stimulation bei den Indomethacin-Versuchen (Abb. 35, 36). Bei den PGE_2 -Versuchen (Abb. 37, 38) verhinderte PGE_2 einen weiteren Histaminanstieg nach der 2. Stimulation bei den Atopikern. Bei den Kontrollen war die Histaminkonzentration im Zellüberstand nach der 2. Stimulation auch ohne PGE_2 nicht höher als nach der 1. Stimulation (sogar etwas geringer).

PGE_2 änderte nichts an dieser Tendenz. Wenn man diese Ergebnisse - mit den oben erwähnten Einschränkungen - beurteilt, so lassen sie wiederum am ehesten eine protektive und limitierende Wirkung von Prostaglandin E_2 erkennen.

Die Bedeutung des Arachidonsäuremetabolismus für den Mechanismus der Histaminfreisetzung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden; ob Stärke und Richtung des Arachidonsäureabbaus (Zyklooxygenase oder Lipxygenase) einen charakteristischen Unterschied zwischen Atopikern und gesunden Personen darstellen und somit ein unterschiedliches Histaminfreisetzungsverhalten verursachen (wofür einige Anhaltspunkte gefunden wurden), könnte durch weitere Untersuchungen erforscht werden, z.B. durch noch strengere Kriterien für die Auswahl der Atopiker.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsaufbau könnte auch zur Messung des zeitlichen Verlaufs der Leukotrienbildung benützt werden. Kürzere Meßintervalle innerhalb der ersten 15 Minuten nach Versuchsbeginn (z.B. alle 2 Minuten) könnten die zeitlichen Zusammenhänge zwischen Histaminfreisetzung und Prostaglandin- bzw. Leukotrienbildung verdeutlichen. Auch eine andere Einteilung der Versuchsgruppen (z.B. Altersgruppen, Schweregrade der Atopie) könnte wichtige Ergebnisse beitragen (es ist beispielsweise eine erhöhte Ansprechbarkeit der Lymphozyten von alten Leuten (über 70 Jahre) auf PGE_2 -induzierte Hemmung der Mitogen-Antwort der Lymphozyten (29 a) bekannt).

Versuche zur direkten Histaminfreisetzung (ohne Brückenbildung durch IgE) werden zur Zeit von U. Walz durchgeführt.

E) Zusammenfassung

Zur Beurteilung der Freisetzung von Histamin aus menschlichen basophilen Leukozyten wurden die Leukozyten aus dem peripheren Blut isoliert und mit Anti-IgE unterschiedlich lange stimuliert (1 min, 5 min, 10 min, 40 min), so daß eine "Freisetzungskinetik" erstellt werden konnte. Die Probanden waren Atopiker und gesunde Kontrollpersonen. Bei beiden Gruppen war das Maximum der Histaminfreisetzung kurz nach Beginn der Stimulierung erreicht. Dabei zeigte sich nach 5-minütiger Stimulation ein signifikanter Unterschied ($p < 0,02$) in der Höhe der Freisetzung zwischen Atopikern und einer gesunden Kontrollgruppe; die Atopiker hatten zu diesem Zeitpunkt deutlich mehr Histamin freigesetzt als die gesunde Kontrollgruppe, was auf einen rascheren Ablauf der Histaminfreisetzung bei Atopikern schließen läßt; nach 10-minütiger Stimulationsdauer war die Freisetzung wieder annähernd gleich.

Durch Hemmung der Zyklooxygenase mit Indomethacin und Acetylsalicylsäure, bzw. durch Zugabe von Prostaglandin E_2 wurde der Effekt von Arachidonsäurederivaten studiert. Die Hemmung der Zyklooxygenase (untersucht mit Indomethacin und Acetylsalicylsäure) führte in allen Fällen zu einer signifikanten Erhöhung der Histaminfreisetzung, die Zufuhr von PGE_2 zu einer signifikanten Verminderung zu allen gemessenen Zeiten. Messungen des von den Leukozyten selbst gebildeten PGE_2 zeigten einen Anstieg der PGE_2 -Konzentration nach der Stimulation. Dabei verminderte PGE_2 bei den Atopikern 5 min und 10 min nach der Stimulation die Histaminfreisetzung stärker als bei den Kontrollpersonen. Die Erhöhung der Histaminfreisetzung durch Zyklooxygenasehemmer bzw. die Verminderung der Histaminfreisetzung durch PGE_2 war in allen Versuchen bereits vor der Stimulation der Leukozyten mit Anti-IgE zu beobachten; dies spricht

für eine Modulation der allgemeinen "Reagibilität" der basophilen Leukozyten. Diese exogene Modulation betraf die Atopiker und die Kontrollgruppe in gleichem Ausmaß.

Unter Stimulierung mit Anti-IgE kam es bei 10 von 36 Untersuchten zur meßbaren Bildung von PGE_2 mit starker individueller Schwankung im zeitlichen Verlauf. Durch Glutathion wurde die PGE_2 -Bildung stark erhöht und zwar bei den gesunden Kontrollen schneller als bei den Atopikern.

Bedenkt man die schnellere Histaminfreisetzung bei den Atopikern, so sind Zusammenhänge zwischen Reagibilität der Basophilen und Prostaglandinentstehung denkbar.

Da die in den Versuchen mit PGE_2 -Zufuhr verwendeten Konzentrationen an PGE_2 weitaus höher waren als die endogen produzierten, kann daraus über eine "endogene" Reagibilitätsänderung der Atopiker keine sichere Auskunft gewonnen werden. Eine bedeutende Rolle der Phospholipide, der Arachidonsäure und ihrer Produkte für die allergische Sofortreaktion ist jedoch sehr wahrscheinlich.

F) Literatur

- (1) ADAMS, G. K., LICHTENSTEIN, L.
In vitro studies of antigen-induced bronchospasm:
Effect of antihistamine and SRS-A antagonist on
response of sensitized guinea-pig and human air-
ways to antigen
J. Immunol., 122, 555 - 562 (1979)

- (2) ADKINSON, N.F., Jr.
Prostaglandin production by human peripheral blood
cells in vitro
J. Lab. Clin. Med., 90, 1043 - 1048 (1977)

- (3) AUSTEN, K. F.
Reaction mechanisms in the release of mediators
of immediate hypersensitivity from human lung tissue
Fed. Proc. 33, 2256 - 2262 (1974)

- (4) AUSTEN, K. F.
Homeostasis of effector systems which also can
be recruited for immunologic reactions
J. Immunol. 121, 793 - 805 (1978)

- (5) ASBOE-HANSEN, C. A.
Origin of synovial mucin: Ehrlich's mast cell
secretory element of connective tissue
Ann. rheum. Dis. 9, 149 - 157 (1950)

- (6) ASH, A. S. F., SCHILD, H. O.
Receptors mediating some actions of histamine
Brit. J. Pharmacol. 27, 427 (1966)

- (7) BACH, M. K., BRASHLER, J. R., GORMAN, R. R.
Slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A)
is a metabolite of arachidonic acid
Fed. Proc. 36, 376 (Abstr.) (1977)

- (8) BARTOSCH, R., FELDBERG, W., NAGEL, E.
Das Freiwerden eines histaminähnlichen Stoffes
bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens
Arch. Ges. Physiol. 230, 129 (1932)
- (9) BOURNE, H. R., LICHTENSTEIN, L. M., MELMON, K. L.
Pharmacological control of allergic histamine
release in vitro: Evidence for an inhibitory
role of 3', 5'-adenosine monophosphate in human
leukocytes
J. Immunol. 108, 695-701 (1972)
- (10) BUSSE, W. W., LEE, T. P.
Decreased adrenergic responses in lymphocytes
and granulocytes in atopic eczema
J. Allergy Clin. Immunol. 58, 586 - 596 (1976)
- (11) COLLIER, H. O. J., SWEATMAN, W. J. F.
Antagonism by fenamates of prostaglandin E_2
and of slow reacting substance on human bronchial
muscle
Nature 219, 864 - 865 (1968)
- (12) CONROY, M. C., ADKINSON, N. F., LICHTENSTEIN, L. M.
Measurement of IgE on human basophils: Relation
to serum IgE and anti-IgE-induced histamine release
J. Immunol. 118, 1317 - 1324 (1977)
- (13) CONROY, M. C.
Releasability - a new dimension in basophil and
mast cell reactivity
in: New Trends in Allergy (J. Ring, G. Burq eds.)
pp. 40 - 45, Springer, Berlin (1981)

- (14) COULSON, C. J., FORD, R. E., MARSHALL, S., WALKER, J. L., WOOLDRIDGE, K. R. H., BOWDEN, K., COOMBS, R. J.
Interrelationship of cyclic nucleotides and anaphylactic reactions
Nature 265, 545 - 547 (1977)
- (15) CREWS, F. T., MORIATA, Y., HIRATA, F., AXELROD, J.
Phospholipid methylation affects immunoglobulin E-mediated histamine and arachidonic acid release in rat leukemia basophils
Biochem. Biophys. Res. Comm. 93, 42 - 49 (1980)
- (16) DORSCH, W., FREY, L.
Allergen tachyphylaxis of guinea pig in vivo: A prostaglandin E mediated Phenomenon?
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol 317, 351 - 356 (1981)
- (17) DOUSA, T. P., DOZOIS, R. R.
Interrelationships between histamine, prostaglandins and cyclic AMP in gastric secretion: A hypothesis
Gastroenterology 73, 904 - 912 (1977)
- (18) DREWMAN, J. M.
The mast cells in urticaria pigmentosa
J. Path. Bact. 63, 513 - 520 (1951)
- (19) DVORAK, A. M., DICKERSON, G. R., GONNELL, A., CASEY, R. W., DVORAK, H. F.
Degranulation mechanisms in human leucemic basophils
Clin. Immunol. Immunopathol. 5, 235 - 244 (1976)
- (20) DUTILH, C. E., HADDEMAN, E., JOUVENAZ, G. H., TEN HOOR, F., NUGTEREN, D. H.
Study of the two pathways for arachidonate oxygenation in blood platelets
Lipids 14, 241 - 246 (1978)

- (21) EHRLICH, P.
Über die spezifische Granulation des Blutes
Arch. Anat. Physiol., Phys. Abt. 3, 571 - 579 (1879)
- (22) EHRLICH, P.
Diskussionsbemerkung zum Vortrage Engels
Dtsch. med. Wschr. 37, 274 (1898)
- (23) ENGINEER, D. M., NIEDERHAUSER, U., PIPER, P. J.,
SIROIS, P.
Release of mediators of anaphylaxis: Inhibition of
prostaglandin synthesis and the modification of
release of slow reacting substances of anaphylaxis
and histamine
Br. J. Pharmacol. 62, 61 - 66 (1978)
- (24) EVANS, R., REISMAN, R. E., WYPICH, J. I., ARBESMAN, C. E.
An immunologic evaluation of ragweed-sensitive
patients by newer techniques
J. Allergy Clin. Immunol. 49, 285-291 (1972)
- (25) FRICK, F., FRICK, U.
Zur Rolle der basophilen Leukozyten und Mastzellen
in Fibrinolyse und Allergie
I. Wirkung von Fibrinolytika und Antifibrinolytika
auf den Degranulationsgrad von basophilen Leukozyten
Folia haematol. (Lpz) 86, 389 - 403 (1966)
- (26) FINDLAY, S. R., LICHTENSTEIN, L. M., SIEGEL, H.,
TRIGGLE, D. J.
Mechanism of contraction induced by partially purified
slow reacting substance from human polymorphnuclear
leukocytes and leukotriene D in guinea pig ileal
smooth muscle
J. Immunol. 126, 1728 - 1730 (1981)
- (27) FISCHER, A., DURANDY, A., GRISCELLI, C.
Role of PGE₂ in the induction of nonspecific T-lympho-
cyte suppressor activity
J. Immunol. 126, 1452 - 1455 (1981)

- (28) FOREMAN, J. C., MONGAR, J. L.
The role of alkaline earth ions in anaphylactic
histamine secretion
J. Physiol. 224, 753 - 768 (1972)
- (29) GILLESPIE, E., LICHTENSTEIN, L. M.
Histamine release from human leukocytes: relation-
ship between cyclic nucleotide, calcium and
antigen concentration
J. Immunol. 115, 1572 - 1576 (1975)
- (29
a) GOODWIN, J.S.
Increased sensitivity to prostaglandin E_2 in old
people
Prostaglandins and Medicine, 3, 395 - 400 (1979)
- (30) GOETZL, E. J.
Occasional notes: Mediators of immediate hypersen-
sitivity derived from arachidonic acid
N. Engl. J. Med. 303, 822 - 824 (1980)
- (31) GOLDSTEIN, B., DEMBO, M., SOBOTKA, A. K., LICHTEN-
STEIN, L. M.
Some invariant properties of IgE-mediated basophil
activation and desensitization
J. Immunol. 123, 1873 - 1882 (1979)
- (32) GOTH, A.
Histamine release: Fusion of the biogenic
amine - containing vesicles with the plasma
Life Sci. 16, 1201 - 1209 (1975)
- (33) GRANT, J. A., LICHTENSTEIN, L. M.
Release of slow reacting substance of anaphylaxis
from human leukocytes
J. Immunol. 108, 897 - 893 (1974)

- (34) HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSSON, B.
Thromboxanes: A new group of biologically active
compounds derived from prostaglandin endoperoxides
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 2994 - 2998 (1975)
- (35) HASTIE, R.
The antigen-induced degranulation of basophil
leukocytes from atopic subjects studied by phase-
contrast microscopy
Clin. exp. Immunol. 8, 48 - 61 (1971)
- (36) HIRATA, F., AXELROD, J.
Enzymatic methylation of phosphatidylethanolamine
increases erythrocyte membrane fluidity
Nature (London) 275, 219 - 220 (1978)
- (37) HIRATA, F., CORCORAN, B. A., VENKATASUBRAMANIAN, K.,
SCHIFFMANN, E., AXELROD, J.
Chemoattractants stimulate degradation of methyl-
ated phospholipids and release of arachidonic
acid in rabbit leukocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 2640 - 2643 (1980)
- (38) HIRATA, F., SCHIFFMANN, E., VENKATASUBRAMANIAN, K.,
SALOMON, D., AXELROD, J.
A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit
neutrophils induced by glucocorticoids
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 2533 - 2541 (1980)
- (39) HIRATA, F., AXELROD, J.
Phospholipid methylation and signal transmission
Science 209, 1082 - 1090 (1980)
- (40) ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T.
Identification of IgE antibodies as a carrier of
reaginic activity
J. Immunol. 99, 1187 - 1198 (1967)

- (41) ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T.
Human reaginic antibodies and immunoglobulin E
J. Allergy 42, 330 - 363 (1968)
- (42) ISHIZAKA, T., ISHIZAKA, K., JOHNSON, S. G. ol,
BENNICH, H.
Histamine release from human leukocytes by anti-
IgE antibodies
J. Immunol. 102, 884 - 892 (1969)
- (43) ISHIZAKA, T., SOTO, C. S., ISHIZAKA, K.
Mechanisms of passive sensitization
III. Number of IgE molecules an their receptor
sites on human basophil granulocytes
J. Immunol. 111, 500 - 511 (1973)
- (44) ISHIZAHKA, T., ISHIZAKA, K.
Triggering of histamine release from rat mast cells
by divalent antibodies against IgE-receptor
J. Immunol. 120, 800 - 805 (1978)
- (45) ISHIZAKA, T.
Membrane events in the triggering of mast cells
In: The mast cell (J. Pepys, A. Edwards eds.)
pp. 21 - 29, Pitman Medical Publishing Co., Ltd.
Kent, England, 1979
- (46) ISHIZAKA, T., HIRATA, F., ISHIZAKA, K., AXELROD, J.
Stimulation of phospholipid methylation, Ca^{2+} -influx,
and histamine release by bridging of IgE receptors
on rat mast cells
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1903 - 1906 (1980)

- (47) JACKSON, R. T., BIRNBAUM, J. E.
Nasal vasoconstrictor activity of a novel PGE₂ analog
Prostaglandins 21, 1015 - 1024 (1981)
- (48) JAFFE, B. M., SMITH, J. W., NEWTON, W. T., PARKER, C. W.
Radioimmunoassay for prostaglandins
Science, 171, 494 - 496 (1971)
- (49) JAKSCHIK, B. A., FALKENHEIM, S., PARKER, C. W.
Precursor role of arachidonic acid in release of
slow reacting substance from rat basophilic
leukemia cells
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 4577 - 4581 (1977)
- (50) JOHNASSEN, O., BECKER, E. L.
Release of kallikrein from guinea pig lung during
anaphylaxis
J. Exptl. Med. 123, 509 - 522 (1966)
- (51) JOHNSON, A. R., MORAN, N. C., MAYER, S. E.
Cyclic AMP content and histamine release in rat
mast cells
J. Immunol. 112, 511 - 517 (1974)
- (52) JUHLIN, L., JOHANSSON, S. G. O., BENNICHT, H.,
HOEGMANN, C., THYRESSON, N.
Immunglobulin E in dermatoses. Levels in atopic
dermatitis and urticaria
Archs. Derm. 100, 12 - 16 (1969)
- (53) KALINER, M.
Human lung tissue and anaphylaxis. Evidence that
cyclic nucleotides modulate the immunologic release
of mediators through effects on microtubular assembly
J. Clin. Invest. 60, 951 - 959 (1977)

- (54) KALINER, M., ORANGE, R. P., AUSTEN, K. F.
Immunological release of histamine and slow reacting
substance of anaphylaxies from human lung
J. Exp. Med. 136, 556 - 567 (1972)
- (55) KANTOR, H. S., HAMPTON, M.
Indomethacin in submicromolar concentrations inhibits
cyclic AMP - dependent protein kinase
Nature 267, 841 (1978)
- (56) KAPLAN, L., WEISS, J., ELSBACH, P.
Low concentrations of indomethacin inhibit
phospholipase A_2 of rabbit polymorphnuclear leukocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 2955 - 2958 (1978)
- (57) KATZ, G., COHEN, S.
Experimental evidence of histamine in allergy
J. Am. Med. Assoc. 117, 1782 - 1794 (1971)
- (58) KAY, A. B., STECHSCHULTE, D. J., AUSTEN, K. F.
An eosinophil leukocyte chemotactic factor of
anaphylaxis
J. Exptl. Med. 133, 602 - 618 (1971)
- (59) KENNERLY, D. A., SULLIVAN, T. J., PARKER, C. W.
Activation of phospholipid metabolism during
mediator release from stimulated rat mast cells
J. Immunol. 122, 152 - 159 (1979)
- (60) KENNERLY, D. A., SULLIVAN, T. J., SYLVESTER, P.,
PARKER, C. W.
Diacylglycerol metabolism in mast cells: a potential
role in membrane fusion and arachidonic acid release
J. Exp. Med. 150, 1039 - 1044 (1979)

- (61) KOENIG, W.
The IgE-receptor
In: New Trends in Allergy (J. Ring, G. Burg eds.)
pp. 21 - 39, Springer Verlag Berlin, Heidelberg
New York (1981)
- (62) KUEHL, F. A., HUMES, J. L., TARNOFF, J., CIRILLO, V. J.,
HAM, E. A.
Prostaglandin receptor site: evidence for an
essential role in the action of luteinizing hormone
Science 169, 883 - 886 (1970)
- (63) LEWIS, R. A., HOLGATE, S. T., ROBERTS, I. J., MAGUIRE, J. F.
OATES, J. A., AUSTEN, K. F.
Effect of Indomethacin on cyclic nucleotide levels
and histamine release from rat serosal mast cells
J. Immunol. 123, 1663 - 1668 (1979)
- (64) LICHTENSTEIN, L. M., OSLER, A. G.
Studies on the mechanisms of hypersensitivity
phenomena. IX. Histamine release from human leuko-
cytes by ragweed pollen antigen
J. Exp. Med. 120, 507 - 530 (1964)
- (65) LICHTENSTEIN, L. M., MARGOLIS, S.
Histamine release in vitro: inhibition by catechola-
mines and methylxanthines
Science 161, 902 - 903 (1968)
- (66) LICHTENSTEIN, L. M., LEVY, D. A., ISHIZAKA, K.
In vitro reversed anaphylaxis: Characteristics of
anti IgE - mediated histamine release
Immunology 19, 831 - 842 (1970)

- (67) MAHMOUD, A. A. F., KELLERMEYER, R. R., WARREN, K. S.
Monospecific antigranulocyte sera against human
neutrophils, eosinophils, basophils and myeloblasts
Lancet 2, 1163 - 1166 (1974)
- (68) MALLORGA, P., TALLMANN, J. E., HENNEBERRY, R. C.
HIRATA, F., STRITTMATTER, W. J., AXELROD, J.
Mepacrine blocks β -adrenergic agonist-induced
desensitization in astrocytoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1341 - 1350 (1980)
- (69) MARONE, G., KAGEY-SOBOTKA, A., LICHTENSTEIN, L. M.
Effects of arachidonic acid and its metabolites on
antigen-induced histamine release from human baso-
phils in vitro
J. Immunol. 123, 1669 - 1677 (1979)
- (70) MARONE, G., KAGEY-SOBOTKA, A., LICHTENSTEIN, L. M.
Control mechanisms of histamine release from
human basophils in vitro: The role of phospholi-
pase A_2 and of lipoxygenase metabolites
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 66 (Suppl. 1),
144 - 148 (1981)
- (71) MATHE, A. A.
Studies on actions of prostaglandins in the lung
Acta Physiol. Scand. Suppl. 441, 1 - 55 (1976)
- (71
a) METZGER, H., WANK, S.A., RIVNAY, B.
The receptor for immunoglobulin E: Taking it apart -
Putting it back together
Monographs in Allergy, 18, 1 - 13 (1983)
- (72) MONCADA, S., VANE, J. R.
Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin
endoperoxides, thromboxane A_2 and prostacycline
Pharmacol. Rev. 30, 293 - 331 (1979)

- (73) MURPHY, R. C., HAMMARSTROEM, S., SAMUELSSON, B.
Leukotriene C: A slow reacting substance from
murine mastocytoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4275 - 4279 (1979)
- (74) NORMAN, P. S., LICHTENSTEIN, L. M., ISHIZAKA, K.
Diagnostic tests in ragweed hay fever: A comparison
of direct skin test, IgE antibody measurement and
basophil histamine release
- (75) OKAZAKI, T., ILEA, V. S., ROSARIO, N. A., REISMAN, R. E.
ARBESMAN, C. E., LEE, J. B., MEDDLETON, E. jr.
Regulatory role of prostaglandin E in allergic
histamine release with observations on the respon-
siveness of basophil leukocytes and the effect
of acetylic acid
J. Allergy Clin. Immunol. 60, 360 - 366 (1977)
- (76) ORANGE, R. P., VALENTINE, M.D., AUSTEN, K. F.
Release of slow reacting substance of anaphylaxis
in the rat: Polymorphnuclear leukocytes
Science 157, 318 - 319 (1967)
- (77) OSLER, A. G., LICHTENSTEIN, L. M., LEVY, D. A.
In vitro studies of human reaginic allergy
Adv. Immunol. 8, 183 - 231 (1968)
- (78) PADAWER, J.
Mast cell structure: Implications for normal
physiology and function
In: The mast cell (J. Pepys, A. Edwards eds.)
Pitman medical Publishing Co., Ltd., Kent, England
pp. 1 - 8 (1979)

- (79) PARKER, C. W., FALKENHEIM, S. F., HUBER, M. M.
Sequential conversion of glutathionyl side chains
of slow reacting substance to cysteinyl-glycyl and
cysteinyl SRS in rat basophilic leukemia cells
stimulated with A 23187
Prostaglandins, 20, 863 - 886 (1980)
- (80) PARWARESCH, M. R.
The human blood basophil
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
(1976)
- (81) PATON, W. D. M.
Histamine release by compounds of simple chemical
structure
Pharmacol. Rev. 9, 269 - 382 (1957)
- (82) PETERS, S. P., KAGEY-SOBOTKA, A., MAC GLASHAN, D. W. JR.,
SIEGEL, M. J., LICHTENSTEIN, L. M.
The modulation of human basophil histamine release
by products of the 5-lipoxygenase pathway.
J. Immunol. 129, 797 - 803 (1982)
- (82
a) PETERS, S.P., SCHLEIMER, R.P., KAGEY-SOBOTKA, A.,
NACLERIO, R.M., McGLASHAN, D.W., Jr., SCHULMAN, E.S.,
ADKINSON, N.F., LICHTENSTEIN, L.M.,
The role of prostaglandin D₂ in IgE-mediated reactions
in man
Trans. Ass. Am. Phys. XCV, 221 (1981)
- (83) PETRONE, W. F., ENGLISH, D. K., WONG, K., McCORD, J. M.
Free radicals and inflammation: Superoxide dependent
activation of a neutrophilic chemotactic factor in
plasma
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1159 - 1163 (1980)

(83

- a) PLESCIA, O. J., SMITH, A.H., GRINWICH, K.
Subversion of immune system by tumor cells and
role of prostaglandins
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 1848 - 1851 (1975)

(84) PRAUSNITZ, C., KÜSTNER, H.

Studien über die Überempfindlichkeit
Zentralbl. Bakteriол. 86, 106 - 169 (1921)

(85) RING, J.

Zyklisches Adenosin-3' 5'-Monophosphat (c-AMP) und
Allergie
Hautarzt 29, 625 - 631 (1978)

(86) RING, J., ARROYAVE, C. M., FRITZLER, M. J.
TAN, E. M.

In vitro histamine and serotonin release by radio-
graphic contrast media (RCM)
Complement-dependent and -independent release
reactions and changes in ultrastructure of human
blood cells
Cli. exp. Immunol. 32, 105 - 118 (1978)

(87) RING, J.

Atopic dermatitis: A disease of general vasoactive
mediator dysregulation
Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 59, 233 - 239 (1979)

(88) RING, J., MATHISON, D.A., O'CONNOR, R.

In vitro cyclic nucleotide responsiveness of leuko-
cytes and platelets in patients suffering from atopic
dermatitis
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 65, 1 - 7 (1981)

- (89) RING, J., O'CONNOR, R.
In vitro histamine and serotonin release studies
in atopic dermatitis
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 58, 322 - 330 (1979)
- (89
a) RING, J.,
Angewandte Allergologie
Münch. med. Wschr. Verlag (1982)
- (90) ROBERT, A., NEZMIS, J. E., PHILLIPS, J. P.
Effects of prostaglandin E₂ on gastric secretion
and ulcer formation in the rat
Gastroenterology 55, 481 - 487 (1968)
- (91) SAMUELSSON, B.
Biosynthesis of prostaglandins
Fed. Proc. 31, 1442 - 1449 (1972)
- (92) SAMUELSSON, B., GOLDYNE, M., GRANSTROEM, E.
HAMBERG, M., HAMMARSTROEM, S., MALMSTEW, C.
Prostaglandins and thromboxanes
Ann. Rev. Biochem. 47, 997 - 1029 (1978)
- (93) SAMUELSSON, B., BORGEAT, P., HAMMARSTROEM, S.,
MURPHY, R. C.
Introduction of a nomenclature: Leukotrienes
Prostaglandins 17, 785- 787 (1979)
- (94) SAMUELSSON, B., HAMMARSTROEM, S.
Nomenclature for leukotrienes
Prostaglandins 19, 645 - 647 (1980)
- (95) SCHELLENBERG, R. R.
Enhancement of phosphatidylinositol (PI) turnover in rat
mast cells
J. Allergy Clin. Immunol. 61, 153 (abstr.) (1978)

- (96) SEGAL, D. M., TAUROG, J. D., METZGER, H.
Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal
for mast cell degranulation
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 2993 - 2997 (1977)
- (97) SIEGHART, W., THEOHARIDES, T. C., ALPER, S. E.
DOUGLAS, W. W., GREENGARD, P.
Calcium dependent protein phosphorylation during
secretion by exocytosis in the mast cell
Nature 257, 329 - 331 (1978)
- (98) SHORE, P. A., BURKHALTER, A., COHN, V. H.
A method for the flourometric assay of histamine
in tissues
J. Pharmacol. Exp. Ther. 127, 182 - 191 (1959)
- (99) SIRAGANIAN, R. P., HOOK, W. A., LEVINE, B. B.
Specific in vitro histamine release from basophils
by bivalent haptens: evidence for activation by
simple bridging of membrane bound antibody
Immunochemistry 12, 149 - 157 (1975)
- (100) SIRAGANIAN, R. P., BRODSKY, M. J.
Automated histamine analysis for in vitro allergy
testing I. A method utilizing allergen-induced
histamine release from whole blood
J. Allergy Clin. Immunol. 57, 525 - 540 (1976)
- (101) SIRAGANIAN, R. P., HOOK, W. A.
Complement-induced histamine release from human
basophils
J. Immunol. 116, 639 - 646 (1976)

- (102) STENSON, W. F., PARKER, C. W., SULLIVAN, T. J.
Augmentation of IgE mediated release of histamine
by 5-hydroxyeicosatetraenoic acid and 12-hydroxy-
eicosatetraenoic acid
Biochem. Biophys. Res. Comm. 96, 1045 - 1052 (1980)
- (103) SUGIO, K., OHUCHI, K., SUGATA, M., TSURUFUJI, S.
Suppression by dexamethasone of vascular permeability
responses induced with leukotrienes C and D in the
rat skin
Prostaglandins 21, 649 - 653 (1981)
- (104) SULLIVAN, T. J., PARKER, K. L., EISEN, S. A., PARKER,
C. W.
Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells
II. Studies on the relationship between intracellular
cyclic AMP concentration and histamine release
J. Immunol. 114, 1480 - 1485 (1975)
- (105) SULLIVAN, T. J., PARKER, K. L., KULCZYCHI, A. Jr.,
PARKER, C. W.
Modulation of cyclic AMP in purified mast cells.
III. Studies on the effect of concanavalin A and
Anti IgE on cyclic AMP concentration during hista-
mine release
J. Immunol. 116, 713 - 716 (1976)
- (106) SULLIVAN, T. J., PARKER, C. W.
Possible role of arachidonic acid and its metabolites
in mediator release from rat mast cells
J. Immunol. 122, 431 - 436 (1979)
- (107) SZENTIVANYI, A.
The beta-adrenergic theory of the atopic abnormality
in asthma
J. Allergy 42, 203 - 211 (1968)

- (108) SZVZEKLIK, A., CZEMIAWSKA-MYSIK, G.
Prostaglandin and aspirin induced asthma
Lancet 1, 488 (1976)
- (109) TAUBER, A. I., KALINER, M., STECHSCHULTE, D. J.
AUSTEN, K. F.
Immunological release of histamine and slow
reacting substance of anaphylaxis from human lung
J. Immunol. 111, 27 - 32 (1973)
- (110) VANDERHOEK, J. Y., BRYANT, R. W., BAILEY, J. M.
Inhibition of leukotriene biosynthesis by the
leukocyte product 15-hydroxy-5, 8, 11, 13 eicosatetra-
enoic acid
J. Bio. Chem. 255, 10064 - 10065 (1980)
- (111) VANE, J. R.
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mech-
anism of action for aspirin like drugs
Nature 231, 232 (1971)
- (112) YAMAMOTO, S., GREAVES, M. W., FAIRLEY, V.M.
Cyclic AMP-induced inhibition of IgE-mediated
hypersensitivity in human skin
Immunology 24, 77 - 83 (1973)

G) Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Arbeitsmöglichkeit in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring danke ich besonders für anregende Diskussionen und seine Beratung bei der Durchführung der Versuche.

Ebenso bedanke ich mich bei FrI. Beier für ihre tatkräftige Unterstützung und freundliche Hilfe im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dorsch in der Kinderpoliklinik der Universität München, der diese Arbeit mitinitiiert hat, sie während der ganzen Zeit mit Interesse diskutierte und bei der Auswertung mit wertvollen Hinweisen zur Seite stand; zudem wurden in seinem Labor die PGE_2 -Werte ermittelt, wofür ich FrI. Höckmeier sehr herzlich danke.

H) Lebenslauf

9. April 1957 geboren in Landshut
Vater: Hans Parzefall, Regierungs-
 direktor
Mutter: Maria Parzefall, Lehrerin

verheiratet mit Dr. rer. nat. Klaus von
der Helm,
1 Kind

1963 - 1967 Besuch der Volksschule in Neu-
 fahrrn/NB

1967 - 1976 Besuch des Hans-Carossa-Gymnasiums
 in Landshut (altsprachlicher Zweig)

1976 Abitur und Beginn des Medizinstudiums
 an der Ludwig-Maximilians-Universi-
 tät München

1978 Ärztliche Vorprüfung

1979 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
1981 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
1982 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

20. Oktober 1982 Approbation als Arzt

